

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München,  
Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

Einfluss von Testosteron auf die lokale Immunzellfunktion nach  
Trauma und Blutverlust im Mausmodell

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Stefan Martin Nitsch  
aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M.K. Angele

Mitberichterstatter: Dr. med. Chr. Klein

Priv. Doz. Dr. med. J. Schopohl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2006

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Auswirkungen von Trauma, Blutverlust und Schock auf das Immunsystem ...	1
1.2	Geschlechtsspezifische Reaktionen des Immunsystems auf Trauma, Blutverlust und Schock.....	5
1.3	Androgen - induzierte Immunsuppression .....	7
1.4	Trauma, Blutverlust und Schock führen zu einer erhöhten Inzidenz von Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen .....	10
1.5	Mechanismus für die immunmodulatorische Kapazität von Testosteron nach Trauma und Blutverlust.....	11
1.6	Fragestellung .....	13
2	Hypothesen und Zielsetzung .....	15
2.1	Einfluss von Testosteron auf die Wundimmunzellfunktion und die Wundheilung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock .....	15
2.2	Einfluss von Testosteron auf zelluläre Signaltransduktionsmechanismen.....	16
3	Material und Methoden .....	17
3.1	Verwendete Tiere .....	17
3.2	Versuchsgruppen .....	17
3.2.1	Wundheilungsstudien .....	17
3.2.2	Studien zur Untersuchung der Signaltransduktionsmechanismen.....	18
3.3	Traumatisch-hämorrhagisches Schockmodell.....	18
3.3.1	Trauma - Laparotomie .....	18
3.3.2	Durchführung des hämorrhagischen Schocks .....	19
3.3.3	Durchführung der Kontrolloperation.....	21
3.4	Reduktion der Plasmaspiegel von Testosteron - Kastration.....	21
3.5	Applikation von 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron <i>in vivo</i> .....	22
3.6	Gewinnung von Immunzellen und Gewebe – <i>in vitro</i> Kulturverfahren.....	24
3.6.1	Vollblut, Plasma .....	24
3.6.2	Wundimmunzellen.....	24
3.6.3	Gewinnung von Wundhaut.....	25
3.6.4	Milzmakrophagen.....	25
3.6.5	Peritonealmakrophagen .....	27
3.7	Bestimmung der Steroidhormon-Plasmaspiegel mittels Radioimmunassay ..	28

3.8	Zytokinbestimmung in den Zellüberständen .....	28
3.8.1	Bestimmung von IL-1 $\beta$ und IL-6 mittels ELISA .....	28
3.9	Immunhistochemie .....	29
3.10	Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut .....	30
3.11	Western Blot Analyse .....	31
3.12	Statistik .....	33
4	Ergebnisse .....	34
4.1	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteronspiegel nach Kastration und Placebo- oder Hormonsubstitution .....	34
4.2	Einfluss von Testosteron auf die Wunde .....	34
4.2.1	Auswirkung von Testosteron auf die Wundimmunzellfunktion <i>in vitro</i> .....	34
4.2.2	Quantitative und qualitative Analyse der Wundimmunzellen .....	35
4.2.3	Auswirkungen von Testosteron auf die <i>in vivo</i> IL-6 Ausschüttung im Bereich der Laparotomiewunde .....	36
4.2.4	Auswirkung von Testosteron auf die Reißfestigkeit der Wundhaut .....	37
4.3	Einfluss von männlichen Sexualhormonen auf die Aktivierung des p38 MAP- Kinase Signaltransduktionsmechanismus .....	40
4.3.1	Auswirkung von Kastration auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase .....	40
4.3.2	Die Auswirkung einer Testosteron-Substitution auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase .....	41
5	Diskussion .....	43
5.1	Relevanz des Tiermodells und der bestimmten Parameter .....	43
5.2	Einfluss von Testosteron auf die Wunde .....	44
5.2.1	Beeinflussung der lokalen Zytokinsekretion durch Testosteron .....	44
5.2.2	Divergente <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Reaktionen in der Wunde .....	48
5.2.3	Auswirkungen von Androgenen auf die Reißfestigkeit der Wundhaut .....	49
5.3	Einfluss von Testosteron auf die Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen .....	51
5.4	Klinische Relevanz .....	54
6	Zusammenfassung .....	55
7	Literaturverzeichnis .....	57
8	Danksagung .....	66

9	Tabellarischer Lebenslauf.....	67
---	--------------------------------	----

## Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
°C	Grad Celsius
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Sandwich-enzyme-linked-immunoessay
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
<i>et al.</i>	et alii
g	Gramm
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF	Insulin-like growth factor
IgG/M	Immunglobulin G/M
IL	Interleukin
ISS	Injury Severity Score
KF	Komplement Faktoren
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mA	Milliampere
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Protein-Kinase
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmHg	Millimeterquecksilber
MOF	Multiorganversagen
M $\phi$	Makrophage

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Newton
NaCl	Natrium-Chlorid
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
nm	Nanometer
NO	Stickstoff
PBS	Phosphate buffered saline
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pg	Pikogramm
RNA	Ribonukleinsäure
sek.	Sekunde
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Std.	Stunde
TGF-β	transformierender Wachstumsfaktor-β
TLR	Toll like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

### 1.1 Auswirkungen von Trauma, Blutverlust und Schock auf das Immunsystem

Unter jungen Menschen in der industrialisierten Welt ist die häufigste Todesursache nach wie vor der traumatisch-hämorrhagische Schock mit nachfolgenden Mikrozirkulationsstörungen, metabolischen Veränderungen sowie einer Depression des Immunsystems (7, 27, 30, 35, 98). Trotz der in den letzten drei Jahrzehnten erfolgten großen Fortschritte im Bereich der diagnostischen Möglichkeiten, der Anwendung modernster operativer Versorgung sowie neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der intensiv-medizinischen Therapie sind die Komplikations- und Letalitätsraten immer noch relativ hoch. Dies gilt vor allem für polytraumatisierte Patienten sowie für Patienten nach großen chirurgischen Eingriffen mit hohem Blutverlust (Abb. 1) (19, 24, 37, 45, 49, 51).

Abb. 1

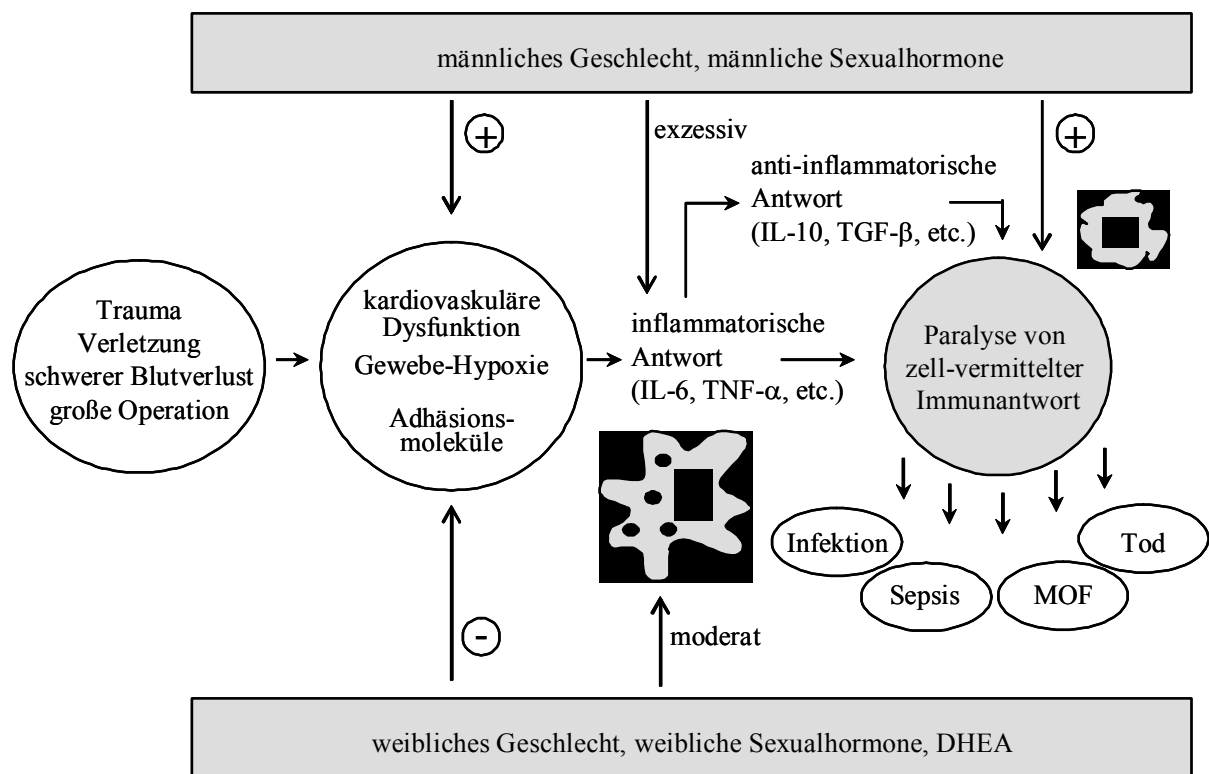


Abb. 1 Schematische Darstellung der Folgen von schweren Verletzungen bis hin zum Tod.



Als Folge einer physikalischen, chemischen oder thermischen Verletzung entsteht zunächst eine lokal begrenzte, nicht-bakterielle Entzündungsreaktion am Ort der Integritätsverletzung. Die hierbei lokal freigesetzten Entzündungsmediatoren initiieren einen Reparaturprozess am Ort der Schädigung. Dies erfolgt über verschiedene Wechselwirkungen mit reaktionsfähigen Zellsystemen (23). Im weiteren Verlauf kann es auf dem Boden dieser zunächst lokalen Freisetzung von Entzündungsmediatoren zur Ausdehnung der inflammatorischen Reaktion bis hin zu einem generalisierten Entzündungssyndrom (SIRS) kommen. Dies geht mit erhöhten Plasmakonzentrationen sowohl pro-, als auch antiinflammatorischer Zytokine einher und stellt einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des posttraumatischen Organversagens dar (Abb. 2) (27, 60, 67, 86).

Abb. 2

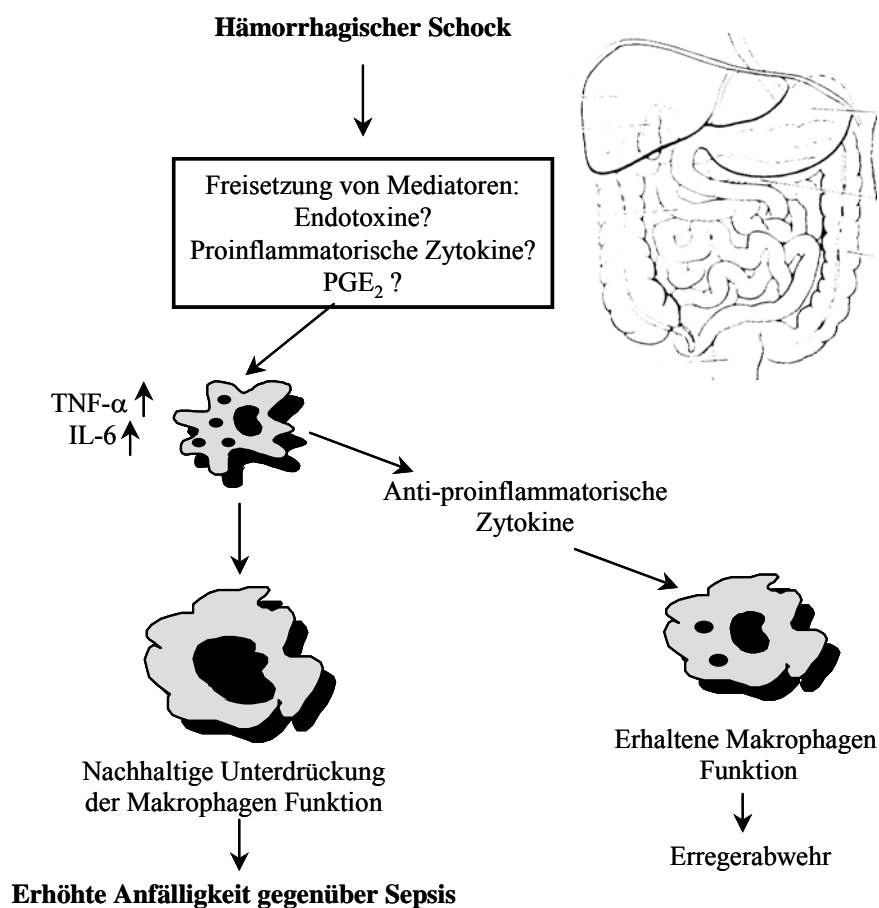


Abb. 2 Schematische Darstellung der Folgen von schweren Verletzungen auf die Aktivierung der humoralen Immunabwehr.

So können im Rahmen von schweren Weichteilschäden, großen Operationen oder ausgeprägten Infektionen anfangs lokal freigesetzte Entzündungsmediatoren systemisch in die Zirkulation eingeschwemmt werden. Nachfolgend kann es über verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel (z.B.) Permeabilitäts- oder Mikrozirkulationsstörungen zur sekundären Beteiligung von Organen kommen, welche ursprünglich keinen Schaden erlitten hatten (91). Dies begünstigt die Entstehung des Vollbildes eines Multiorganversagens, das mit einer Inzidenz von etwa 30 % nach traumatisch-hämorrhagischem Schock auftritt und eine Letalität zwischen 30 % und 60 % aufweist (61, 80, 92, 99).

Die pro- und antiinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  scheinen in der Frühphase nach einem Trauma eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade zu spielen. Im Einzelnen erfolgt ein schneller Anstieg von Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), gefolgt von IL-1 $\beta$  und IL-6. Diese genannten proinflammatorischen Zytokine bewirken einerseits die Produktion weiterer Zytokine und Mediatoren, die ihrerseits an der Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion beteiligt sind. Andererseits induzieren sie aber auch die Bildung antiinflammatorischer Zytokine und leiten somit eine nachhaltige Immunsuppression ein.

In einer Reihe von klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass kontinuierlich erhöhte Plasmaspiegel dieser proinflammatorischen Zytokine nach septischem Schock sowie nach Verbrennungen oder einem Trauma einen ungünstigen Prognosefaktor darstellten, der im weiteren Verlauf der Erkrankung mit einer erhöhten Mortalitätsrate verbunden war (Abb. 3) (33, 40, 72, 100). Als Folge dieser entzündlichen Reaktion nach Trauma und Blutverlust zeigte sich neben anderen pathophysiologischen Veränderungen eine Störung der spezifischen Immunantwort, die mit einer erhöhten Infektions- und Mortalitätsrate einhergeht (27, 67).

Abb. 3

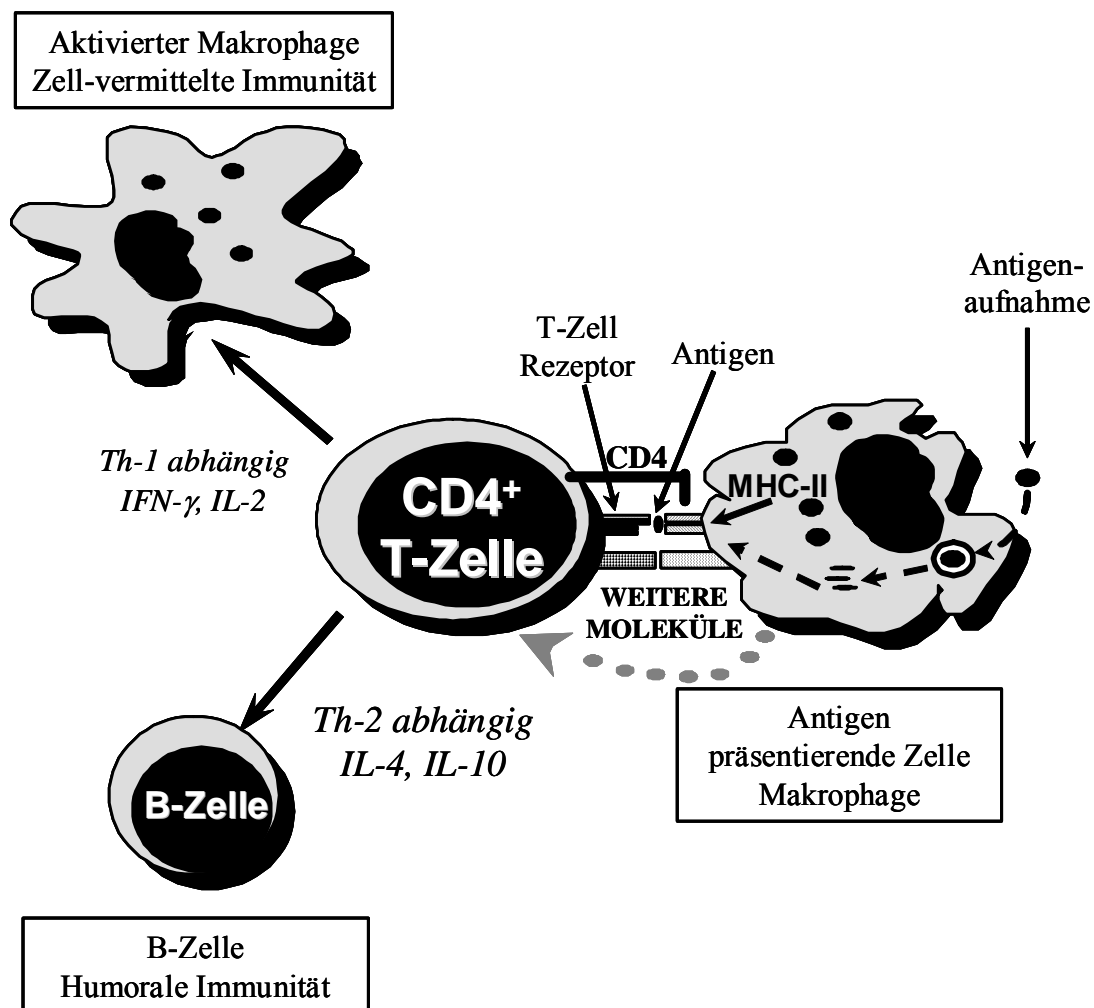


Abb. 3 Schematische Darstellung der Antigenaufnahme und deren anschließende Präsentation durch Makrophagen sowie die Aktivierung von T-Zellen mit Hilfe der CD4 Komplexe zu einer Th-1 bzw. Th-2 gewichteten Immunantwort.

Trotz einiger Erfolg versprechender Ergebnisse in präklinischen, tierexperimentellen Studien führte der klinische Einsatz diverser immunmodulatorischer Substanzen bisher zu keiner signifikanten Senkung der hohen Letalität von Patienten nach Trauma und schwerem Blutverlust (1, 36, 42). Ein möglicher Ansatzpunkt zur Erklärung dieser Misserfolge könnte in den Ergebnissen neuerer klinischer und tierexperimenteller Studien liegen, die eine geschlechtsspezifische Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zeigen. Obwohl eine Reihe von Untersuchungen geschlechtsspezifische Unterschiede in der zellvermittelten und humoralen Immunreaktion aufzeigen (5), wurden in der Vergangenheit die meisten tierexperimentellen Studien im Zusammenhang mit traumatisch-hämorrhagischem

Schock nur an männlichen Versuchstieren durchgeführt und geschlechtsspezifische Reaktionen in klinischen Studien nicht ausreichend berücksichtigt.

## 1.2 Geschlechtsspezifische Reaktionen des Immunsystems auf Trauma, Blutverlust und Schock

In einer Reihe neuer klinischer sowie epidemiologischer Studien konnten Geschlechtsunterschiede in Inzidenz und Morbidität sepsisbedingter Komplikationen nach Trauma oder größeren Operationen nachgewiesen werden (24, 31, 46, 64, 76). Die Mehrzahl der registrierten Unfallopfer ist männlichen Geschlechts (46, 64). Geschlechtsunterschiede bestehen jedoch nicht nur in der Prävalenz von Trauma, sondern vor allem auch in der nachfolgenden Anfälligkeit gegenüber septischen Komplikationen.

Männliches Geschlecht scheint einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung septischer Komplikationen nach mittelschwerem Trauma (Injury Severity Score, ISS 16-25) darzustellen (82, 83). Es wurde ein weibliches und ein männliches Kollektiv mit vergleichbar schwerem Trauma und ähnlichem Verletzungsmuster untersucht. Männliche Patienten zeigten eine signifikant höhere Inzidenz an septischen Komplikationen und Multiorganversagen als weiblichen Patientinnen nach Polytrauma (82, 83). Bone konnte in einer retrospektiven Studie, die vier große Sepsisstudien mit einschloss, nachweisen, dass Männer eine erhöhte Morbidität von und Mortalität an septischen Komplikationen aufweisen (24).

Angesichts dieser Ergebnisse wurde eine Serie von tierexperimentellen Studien initiiert, welche die Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock in Abhängigkeit vom Geschlecht untersuchten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass weibliche Mäuse 24 Stunden (Std.) nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine unveränderte Splenozytenfunktion aufwiesen. Im Gegensatz dazu war die Aktivität der Splenozyten bei den männlichen Mäusen signifikant vermindert (Abb. 4) (109).

Abb. 4

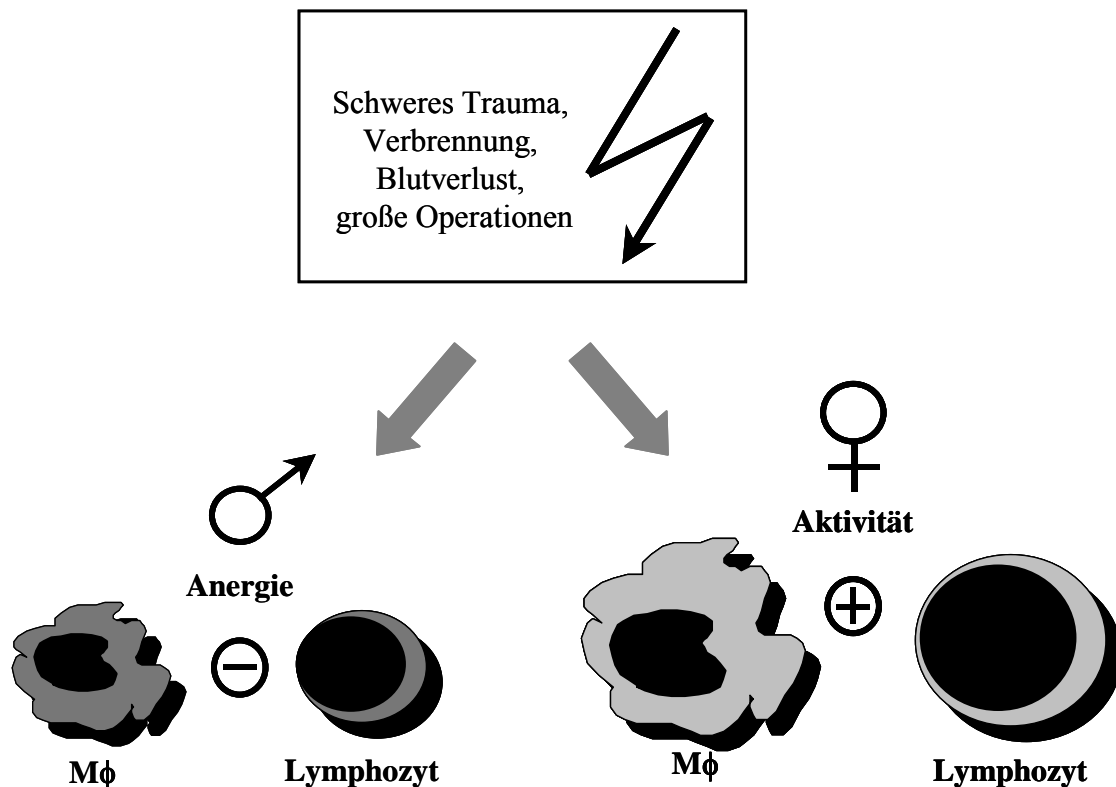


Abb. 4 Schematische Darstellung der geschlechtsspezifischen Reaktion von Maus-Makrophagen und Lymphozyten nach schwerer Verletzung.

Des Weiteren zeigten Milz- und Peritonealmakrophagen weiblicher Tiere in der Proöstrus Phase ihres Zyklus im Vergleich zu Kontrolltieren eine erhöhte Kapazität, IL -1 und IL-6 zu sezernieren (105). Im Gegensatz dazu fand sich eine signifikant unterdrückte Immunantwort bei männlichen Tieren nach traumatisch-hämorrhagischem Schock im Vergleich zu Kontrolltieren (27, 108).

Trotz dieser Ergebnisse wird das Geschlecht sowie das Alter der Versuchspersonen, beziehungsweise (bzw.) -tiere in den meisten Studien, die immunologische Veränderungen nach Schock und Trauma untersuchen, nicht berücksichtigt. Die sich hieraus ergebende Unvollständigkeit macht weitere Studien notwendig, um den geschlechtsspezifischen Reaktionsabläufen der Immunantwort Rechnung zu tragen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen umfassender zu klären.

### 1.3 Androgen - induzierte Immunsuppression

Männliche Geschlechtshormone scheinen für die Unterdrückung der Immunreaktionen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei männlichen Versuchstieren verantwortlich.

Die Reduktion der Testosteronplasmaspiegel durch Kastration männlicher Tiere verhinderte eine Immundepression nach traumatisch-hämorrhagischem Schock (10). Die Substitution kastrierter männlicher Tiere mit Testosteron ( $5\alpha$ -Dihydrotestosteron, DHT) führte zu einer erneuten Unterdrückung der Immunantwort nach einem solchen Schock (10). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Testosteronplasmaspiegel in weiblichen Mäusen durch Gabe von Testosteron zu einer Unterdrückung der zellvermittelten Immunität nach Schock führt (3, 4). Diese Immundepression war vergleichbar mit der in männlichen Mäusen zu beobachtenden Immunantwort (3, 4). Im Gegensatz dazu verhindert die Gabe des weiblichen Sexualhormons Östrogen die Testosteron induzierte Unterdrückung der zellvermittelten Immunantwort (Abb. 5) (10).

Interessanterweise war bei den kastrierten männlichen Tieren, die lediglich einer Kastroperation unterzogen wurden, die Makrophagenfunktion unterschiedlicher Kompartimente sowie die Splenozytenaktivität im Vergleich zu schein-kastrierten männlichen Kontrolltieren unverändert (10).

Abb. 5

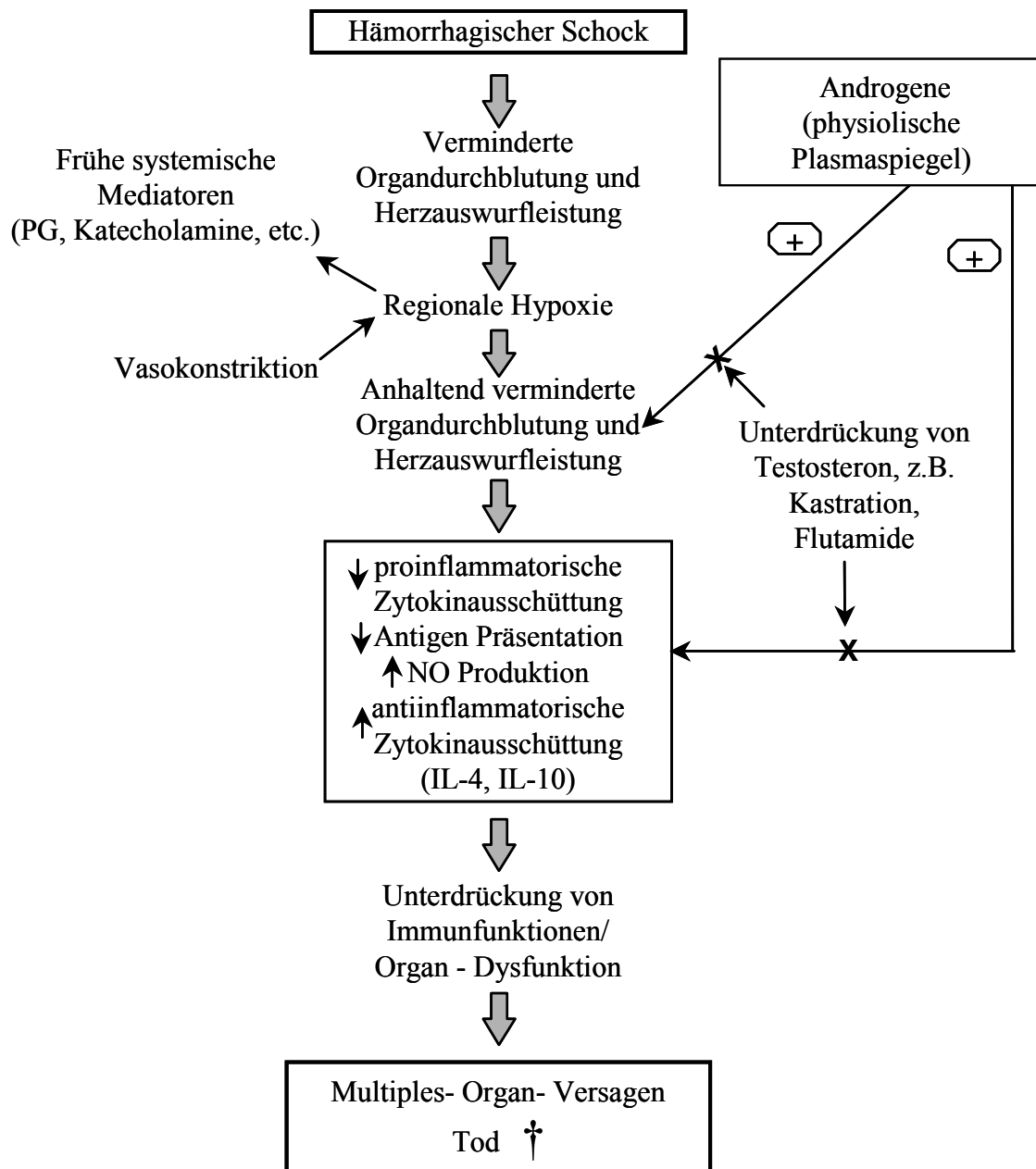


Abb. 5 Schematische Darstellung der pathophysiologischen Auswirkungen eines hämorrhagischen Schocks und die geschlechtsspezifischen Einflüsse von Testosteron auf die Immunantwort und deren Folgen.

Trotz der Erfolg versprechenden Ergebnisse der oben genannten Studie im Hinblick auf die Immunfunktion von kastrierten Mäusen ist ein entsprechendes Vorgehen bei männlichen polytraumatisierten Patienten selbstverständlich nicht durchführbar. Die Durchführung einer vorübergehenden medikamentösen Kastration mit Androgen-Rezeptorblockern scheint hingegen praktikabel zu sein (Abb. 6). Studien an männlichen Mäusen nach schwerem Blutverlust zeigten, dass durch Gabe des

Androgenrezeptorblockers Flutamid an drei aufeinander folgenden Tagen mit einer Dosierung von 25 Milligramm/Kilogramm (mg/kg) Körpergewicht (KG) und anschließender Induktion einer Sepsis die zellvermittelte Immunfunktion auf das Niveau weiblicher Mäuse angehoben werden konnte (12). Des Weiteren zeigte sich eine signifikant verbesserte Überlebensrate der mit Flutamid behandelten hämorrhagisierten Mäuse nach Induktion einer polymikrobieller Sepsis gegenüber unbehandelten Mäusen (55 % [Verum] im Vergleich zu 23 % [Placebo] nach 9 Tagen Beobachtungszeit im Anschluss an Punktion des Blinddarmes) (12).

Abb. 6

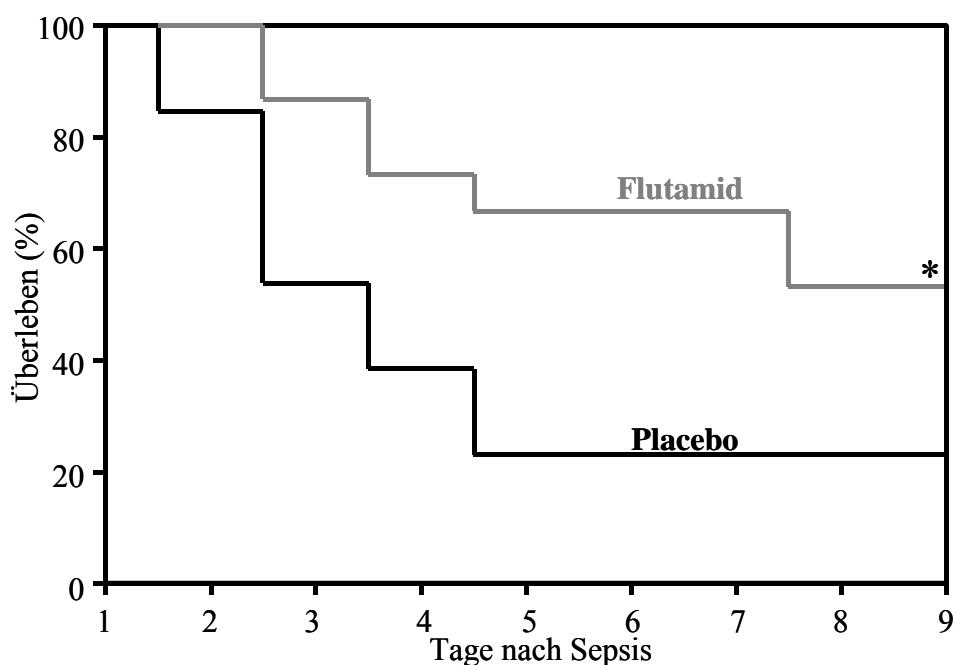


Abb. 6 Überlebenskurven männlicher Mäuse nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und anschließend induzierter polymikrobieller Sepsis durch CLP. Die Mäuse waren entweder mit Placebo oder Flutamid behandelt worden. \* $p < 0,05$  Z-Test vs. Placebo (Angele et al. 1997)

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Veränderung der Hormonplasmaspiegel nicht nur zu einer vorübergehenden Verbesserung der zellvermittelten Immunität führt, sondern zusätzlich die Anfälligkeit gegenüber nachfolgender Sepsis verringert. Dies äußert sich in einer signifikant erhöhten Überlebensrate von Versuchstieren nach Blutverlust und Sepsis. Kurzzeitige Veränderungen der Hormonplasmaspiegel oder die Gabe von Testosteronrezeptorblockern für wenige Tage sind mit geringen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden. Somit stellen diese Ergebnisse erste, Erfolg versprechende Ansätze für die



Prävention und Behandlung der Immundepression dar, die in männlichen polytraumatisierten Patienten beobachtet wird. Daher ermutigen sie zu weiterführenden Untersuchungen auf dem Gebiet der geschlechtsbedingten Unterschiede der Immunfunktion. Trotz dieser Ergebnisse ist unbekannt, ob die lokale Immunreaktion am Ort des Traumas (Wundimmunzellen) vergleichbar zur systemischen Immunantwort (Makrophagen unterschiedlicher Kompartimente) durch männliche Sexualhormone moduliert wird.

Im Gegensatz zu männlichen Sexualhormonen haben weibliche Sexualhormone, z.B. 17 $\beta$ -Östradiol, immunprotektive Eigenschaften (12, 62). Die Auswirkungen von weiblichen Sexualhormonen sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsarbeit gewesen.

#### 1.4 Trauma, Blutverlust und Schock führen zu einer erhöhten Inzidenz von Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen

Die experimentellen Ergebnisse, die die geschlechtsspezifische Immunantwort nach Schock charakterisieren, wurden bisher ausschließlich anhand der systemischen Immunantwort nach Trauma und Schock untersucht. Das Verhalten der Immunzellen am Ort des Traumas sowie die lokale Immunreaktion in der Wunde und der Haut nach Trauma und Blutverlust wurden bislang ausschließlich bei Patienten oder Versuchstieren bestimmt, ohne die geschlechtsspezifische Wirkung der Sexualhormone auf das Immunsystem zu berücksichtigen.

Grundsätzlich weisen klinische, als auch experimentelle Studien eine Störung der Wundimmunzell-Funktion sowie der Wundheilung nach Trauma und Blutverlust (8, 9, 39, 54, 69, 75).

Ferner konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass ein hoher Blutverlust beim polytraumatisierten Patienten mit einer signifikant erhöhten Rate an Wundkomplikationen einhergeht (26, 52, 54, 71, 75, 77, 78, 84, 106). Insbesondere stellen die Dauer des Schockzustandes sowie der Umfang des Blutverlustes entscheidende Risikofaktoren für die Entwicklung von postoperativen Wundinfektionen dar (85, 101, 106). Auch konnte eine deutliche Verzögerung der Wundheilung nach Blutverlust und Trauma nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang fand sich eine verringerte Kollagenanreicherung in Wunden von Patienten mit gleichzeitig bestehendem großen Trauma und Blutverlust (39). Des Weiteren zeigte sich bei

Patienten, die wegen eines Ulkus ventriculi operiert wurden, wiesen eine erhöhte postoperative Dehiszenzrate der Laparotomiewunde auf, wenn es sich hierbei um ein blutendes Ulkus ventriculi handelte (54, 75). In tierexperimentellen Studien konnte vergleichbar nachgewiesen werden, dass eine Beeinträchtigung der Wundheilung nach thermischer Verletzung, nach Frakturen oder polymikrobieller Sepsis auftritt (26, 32, 52, 54, 75).

Der komplexe Vorgang der Zellproliferation und Gefügewiederherstellung in der Wunde scheint entscheidend durch Zytokine beeinflusst zu werden (54, 75). In verschiedenen Tiermodellen konnte die zeitliche Abfolge von Zytokinen in der Wunde und die Zytokinsekretion durch Wundimmunzellen untersucht werden (43, 48, 54, 63, 74, 75). In diesen Studien scheinen proinflammatorische Zytokine die Produktion von Kollagen zu verringern, wohingegen das antiinflammatorische Zytokin transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) die Kollagenanreicherung steigert (25, 39, 65, 66).

Darüber hinaus konnte eine unterdrückte Wundimmunzellfunktion mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Wundinfektionen in tierexperimentellen Studien verbunden werden (71) und begünstigte die Entstehung von postoperativen Wundinfektionen, die selbst Ausgangspunkt septischer Komplikationen sein können (50, 59).

Obwohl in einer Vielzahl von Studien immunmodulatorische Eigenschaften von Sexualhormonen auf die systemische Immunantwort nachgewiesen wurden, ist deren Einfluss auf die lokale Immunreaktivität unbekannt. Daraus könnten möglicherweise neue Therapiestrategien zur Verminderung von Wundkomplikationen erarbeitet werden.

## 1.5 Mechanismus für die immunmodulatorische Kapazität von Testosteron nach Trauma und Blutverlust

In der Zwischenzeit sind weit reichende Informationen über nachgewiesene Effekte von Sexualhormonen auf die Reaktionen immunkompetenter Zellen in verschiedenen Kompartimenten nach traumatisch-hämorrhagischem Schock erhältlich. Dennoch ist bisher wenig über die, dieser geschlechtspezifischen Antwort zugrunde liegenden, und die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine steuernden zellulären Mechanismen bekannt.

Auf molekularer Ebene scheint die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, z.B. der p38 mitogenaktivierten (MAP) - Kinase an der Vermittlung der geschlechtsspezifischen Immunantwort nach Trauma und Blutverlust beteiligt zu sein.

Es konnte allgemein gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung von p38 MAP-Kinase durch weitere MAP-Kinasen über mehrere Zwischenschritte die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in Makrophagen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock induziert wird. Dies stellt somit einen entscheidenden Schritt bei der Kontrolle der inflammatorischen Reaktion dar. Eine Reihe von Studien schreibt der p38 MAP-Kinase in Zellen des Immunsystems eine zentrale Rolle bei der Vermittlung und Steuerung der inflammatorischen Reaktion nach Schock zu (22, 57, 81, 90). So scheint die Phosphorylierung von Proteinen der MAP-Kinase-Familie und die nachfolgende Aktivierung von Nukleärem Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) im Zellkern eine Schlüsselrolle in der Unterdrückung der zellvermittelten Immunität nach Schock zu spielen (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, dass p38 MAP-Kinase Signaltransduktionsmechanismen in Abhängigkeit vom Geschlecht unterschiedlich stark aktiviert sind. So nimmt die Aktivierung von p38 MAP-Kinase in männlichen Versuchstieren nach traumatisch-hämorrhagischem Schock signifikant zu (11). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei weiblichen Versuchstieren eine Verringerung der p38-Aktivierung unter solchen Bedingungen (11). Es konnte in diesen Studien weiterhin gezeigt werden, dass diese unterschiedliche Expression nicht auf die unterschiedliche Verfügbarkeit von unphosphoryliertem p38 zurückzuführen war. So wurde die Expression der nicht aktivierten Form von p38 weder durch das Geschlecht noch durch den traumatisch-hämorrhagischen Schock beeinflusst.

Nachdem die Aktivierung von p38 an der Kontrolle der inflammatorischen Reaktion nach Trauma und Blutverlust beteiligt ist (90), scheinen Unterschiede in der p38-Aktivierung zu der geschlechtsspezifischen Immunreaktion beizutragen. Weiteres Ziel dieser Dissertationsarbeit war es daher zu untersuchen, ob Testosteron zu einer Modulation der Signaltransduktionsmechanismen führt. Die Aktivierung dieser Signaltransduktionsmechanismen tritt bereits sehr früh (zwei Std.) nach Trauma und hämorrhagischem Schock auf. Da zu einem so frühen Zeitpunkt (zwei Std.) aus der Wunde noch keine Immunzellen gewonnen werden können, wurde dies exemplarisch an zwei weiteren Kompartimenten (Milz und Peritoneum) verifiziert. Es wird angenommen, dass diese Ergebnisse auf andere Kompartimente und somit auch auf die lokalen Immunzellen in der Wunde übertragbar sind.

Abb. 7

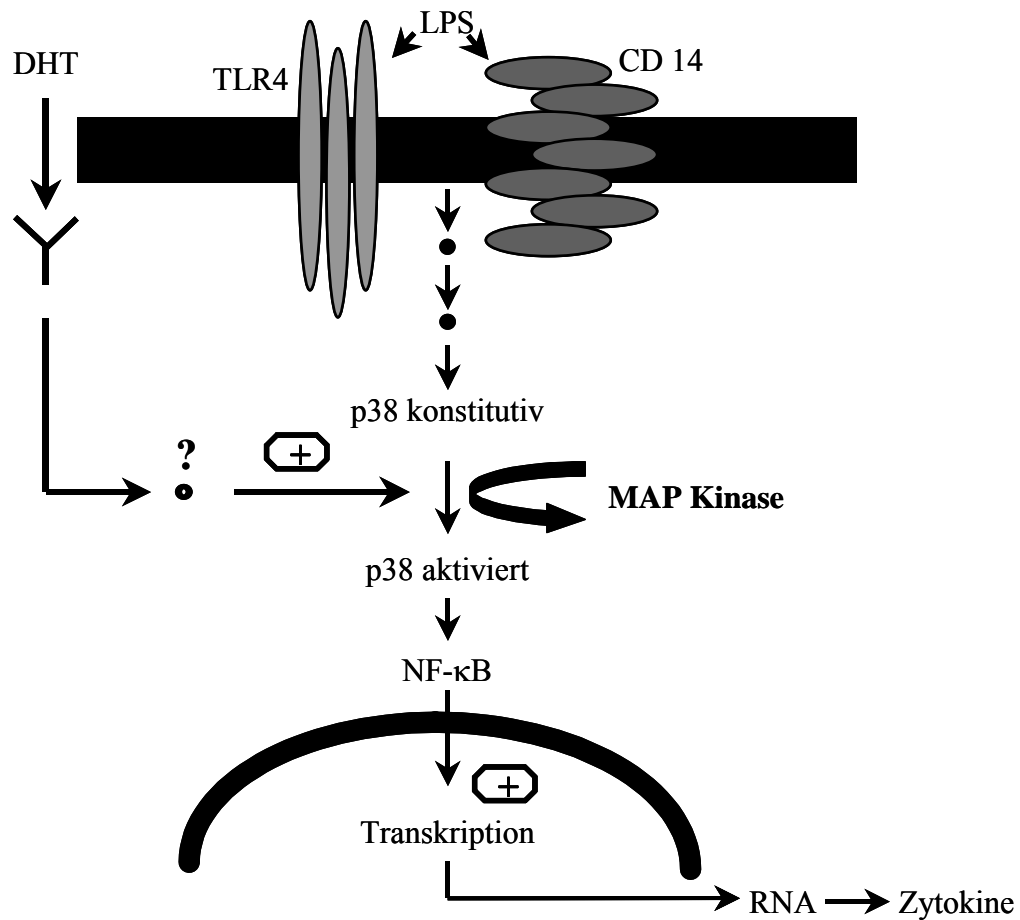


Abb. 7 Schematische Darstellung der intrazellulären Aktivierungskaskade nach traumatisch-hämorrhagischem Schock am Beispiel der untersuchten Aktivierung von p38 und der postulierte Einfluss von Testosteron auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase.

## 1.6 Fragestellung

Es scheint somit erwiesen, dass Sexualhormone die humorale und zelluläre Immunität beeinflussen. Auf Grund dessen lässt sich eine geschlechtsspezifische Immunreaktion nach Trauma und Blutverlust zeigen. Es ist jedoch unbekannt, ob männliche Sexualhormone auch die lokale Immunantwort am Ort des Traumas nach traumatisch-hämorrhagischem Schock modulieren. Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen.

Des Weiteren sollten mögliche Mechanismen für die immunmodulatorische Kapazität von männlichen Sexualhormonen ermittelt werden. Hierfür wurde

beispielhaft untersucht, ob ein direkter Einfluss männlicher Sexualhormone auf bekannte, die Immunantwort auf zellulärer Ebene steuernde Signaltransduktionsmechanismen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock für die Immunmodulation durch Testosteron verantwortlich ist.

## 2 Hypothesen und Zielsetzung

### 2.1 Einfluss von Testosteron auf die Wundimmunzellfunktion und die Wundheilung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock

➤ *Männliche Sexualhormone führen zu einer unterdrückten Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Unter solchen Bedingungen hat das männliche Sexualhormon Testosteron auch einen immunsuppressiven Effekt auf Wundimmunzellen.*

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde jeweils ein Teil der männlichen Mäuse 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation kastriert, bzw. schein-kastriert. Bei allen Versuchstieren wurden Wundimmunzellen gewonnen und deren *in vitro* Sekretionskapazität von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen mit und ohne Stimulation gemessen.

➤ *Testosteron führt nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zu einer in vivo nachweisbaren Unterdrückung der zellvermittelten Immunität.*

Zu diesem Zweck wurde jeweils ein Teil der männlichen Mäuse 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation kastriert, bzw. schein-kastriert. Bei allen Versuchstieren wurde Haut aus dem Bereich der Laparotomie-Wunde gewonnen. In der Wundhaut wurde mittels Immunhistochemie die Expression von IL-6 bestimmt.

➤ *Das männliche Sexualhormon Testosteron ist für eine verschlechterte Wundheilung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verantwortlich.*

Zu diesem Zweck wurde erneut ein Teil der männlichen Mäuse 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation kastriert, bzw. schein-kastriert. Bei allen Versuchstieren wurde 10 Tage nach Durchführung der Kontrolloperation oder des traumatisch-hämorrhagischen Schocks ein Haut-Muskelpräparat aus dem Bereich der Laparotomie-Wunde gewonnen. Anschließend wurde die Reißfestigkeit der Wunde unter kontrollierten Bedingungen untersucht.

## 2.2 Einfluss von Testosteron auf zelluläre Signaltransduktionsmechanismen

➤ *Testosteron beeinflusst direkt die Aktivierungskaskade intrazellulärer Signaltransduktionsmechanismen, die für die geschlechtsspezifische Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock auf molekularer Ebene verantwortlich sind.*

Zu diesem Zweck wurden Makrophagen von männlichen Versuchstieren nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation aus Milz und Peritoneum isoliert. Ein Teil der Tiere ist 2 Wochen vor Durchführung des Experiments kastriert und entweder mit Placebo, Testosteron oder Östrogen behandelt worden. Anschließend wurden die Makrophagen stimuliert und die Aktivierung des Signaltransduktionsmechanismus der MAP-Kinase-Gruppe p38 untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Tiere

Für die tierexperimentellen Studien am Institut für Chirurgische Forschung in München wurden C3H/HeN Mäuse von Charles River, Sulzfeld, Deutschland verwendet. Die Mäuse hatten bei der Versuchsdurchführung ein Alter von ca. 7 Wochen und ein Gewicht von 24-26 Gramm (g). C3H/HeN Mäuse wurden für die Studien benutzt, da diese Mäuse über eine ausgewogene Th1 – Th2 Immunantwort verfügen (14). Diese Immunreaktion ist vergleichbar zu der bei Patientenstudien zu beobachtenden Immunantwort (44).

#### 3.2 Versuchsgruppen

##### 3.2.1 Wundheilungsstudien

Zur Untersuchung des Einflusses von Testosteron auf die Funktion der Wundimmunzellen sowie auf die Wundheilung wurden männliche Mäuse in zwei Versuchsgruppen randomisiert und anschließend entweder einer Kontrolloperation oder einem traumatisch-hämorrhagischem Schock mit anschließender Flüssigkeitssubstitution unterzogen (Abb. 8).

Abb. 8

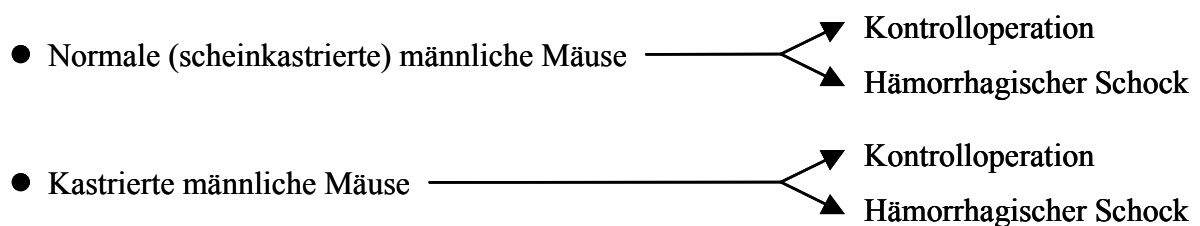


Abb. 8 Aufstellung der einzelnen Versuchsgruppen zur Untersuchung der Auswirkungen von Testosteron auf die Funktion der Wundimmunzellen und auf die Wundheilung.



### 3.2.2 Studien zur Untersuchung der Signaltransduktionsmechanismen

Um den Einfluss von Sexualhormonen auf die Signaltransduktionsmechanismen zu untersuchen, wurden männliche Mäuse in vier Versuchsgruppen a 6 – 7 Tiere randomisiert und anschließend entweder einer Kontrolloperation oder einem traumatisch-hämorrhagischem Schock mit anschließender Flüssigkeitssubstitution unterzogen (Abb. 9).

Abb. 9

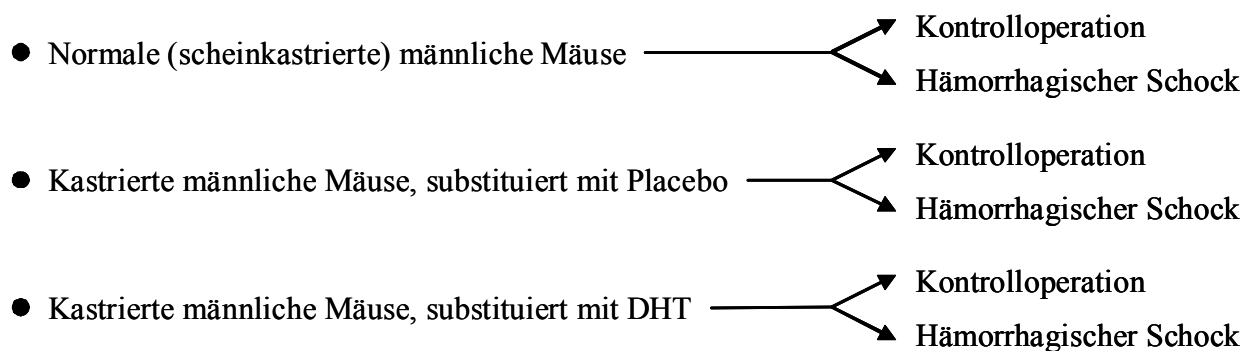


Abb. 9 Aufstellung der einzelnen Versuchsgruppen zur Untersuchung der Auswirkungen von männlichen Sexualhormonen auf die intrazelluläre Aktivierung des p38 MAP-Kinase Signaltransduktionsmechanismus in Makrophagen.

## 3.3 Traumatisch-hämorrhagisches Schockmodell

### 3.3.1 Trauma - Laparotomie

Die Mäuse wurden nach Einleiten einer Inhalationsnarkotisierung mit Isofluran auf dem Rücken fixiert, und die Bauchwand durch Rasur und Desinfektion mit 75 % Alkohol präpariert. Anschließend wurde bei den Tieren eine 2,5 Zentimeter (cm) lange Laparotomie unter sterilen Operationsbedingungen vorgenommen. Hierfür wurde zunächst die Haut von einer kleinen Inzision aus im Bereich des Abdomen stumpf von der Muskelschicht abpräpariert und unter Sicht in der Mittellinie eröffnet. Anschließend wurde der muskulöse Teil der Bauchdecke im Bereich der Linea alba durchtrennt und somit die Bauchhöhle eröffnet. Die Muskelschicht wurde ohne weitere Manipulationen mit einem 6-0 Ethilon Faden und die Haut mit einem 5-0 Ethilon Faden verschlossen

(Abb. 10). Danach wurde entweder der hämorrhagische Schock eingeleitet oder die Kontrolloperation bei den Versuchstieren durchgeführt.

Bei einem Teil der Mäuse wurden zur Gewinnung von Wundimmunzellen und Wundflüssigkeit vor Verschluss der Haut subkutan vier mit Natrium-Chlorid (NaCl) 0.9 % befeuchtete Polyvinylschwämmchen (0,5 cm × 0,5 cm × 0,5 cm) unter sterilen Bedingungen eingelegt (Abb. 10).

Abb. 10

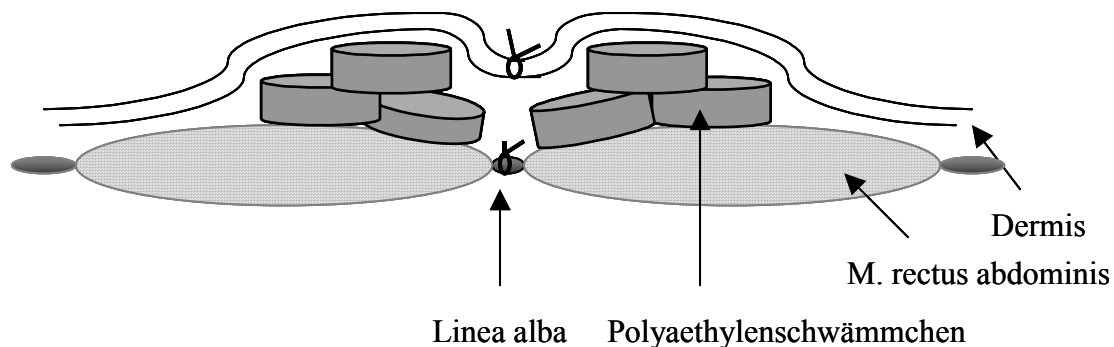


Abb. 10 Schematischer Querschnitt des Versuchsaufbaus nach Durchführung der Laparotomie und Einlage der Polyvinylschwämmchen zur Gewinnung der Wundimmunzellen und der Wundflüssigkeit.

### 3.3.2 Durchführung des hämorrhagischen Schocks

Unter Beibehaltung der Inhalationsnarkose mit Isofluran wurde die Haut der Mäuse in beiden Leisten rasiert, mit 75 % Alkohol desinfiziert und auf einer Länge von ca. 0,5 cm eingeschnitten. Unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskops wurden die Femoralarterien beiderseits stumpf freipräpariert, proximal angeschlungen sowie distal ligiert. Nach Punktion mit einer Nadel wurde in beide Femoralarterien jeweils ein Polyäthylen-Katheter (Clay-Adams, Parsippany, NJ) eingelegt und mit den proximalen Ligaturen fixiert. Anschließend wurde einer der beiden Katheter mit einem digitalen, geeichten Blutdruckmessgerät zur kontinuierlichen Überwachung des Blutdrucks verbunden. Über den jeweils anderen Katheter wurde mit Hilfe einer angeschlossenen 1 Milliliter (ml) Spritze Blut aspiriert, um den systolischen Blutdruck von ca. 90 Millimeterquecksilber (mmHg) (Normalblutdruck einer Maus) für die Dauer von 90 Minuten (min.) auf Werte von  $35 \pm 5$  mmHg zu reduzieren (Abb. 11, 12). Während der Durchführung des hämorrhagischen Schocks waren die Tiere nicht anästhesiert, da

von Narkotika selbst eine blutdrucksenkende Wirkung ausgeht und dadurch eine standardisierte Versuchsdurchführung in einem Blutdruck kontrollierten Schockmodell nicht gewährleistet gewesen wäre.

Abb. 11

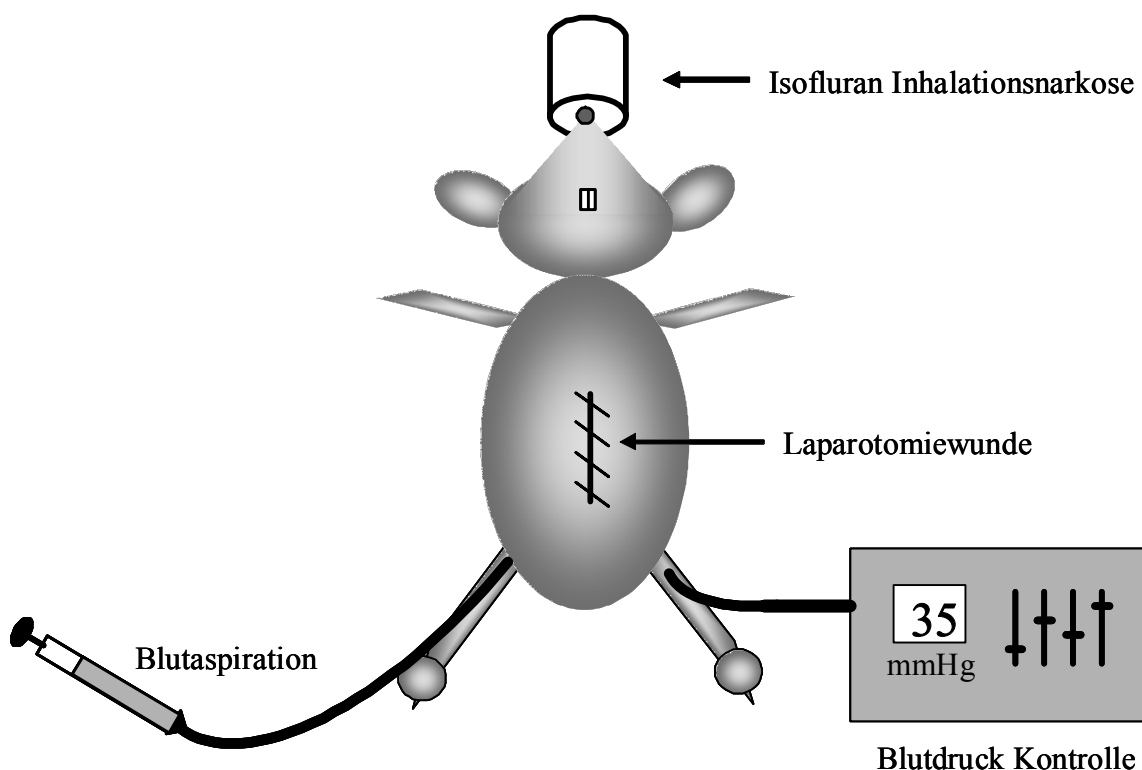


Abb. 11 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Durchführung der Laparotomie sowie zur Durchführung und Überwachung des hämorrhagischen Schocks und der anschließenden Flüssigkeitssubstitution.

Nach Beendigung der 90-minütigen Hypotensionsphase wurde den Tieren das vierfache Volumen der abgenommenen Blutmenge in Form von Ringer's Laktat Lösung substituiert. Hierfür wurde das berechnete Volumen an Ringer's Laktat Lösung mit Hilfe der implantierten Katheter über einen Zeitraum von 30 min. infundiert. Im Anschluss an die Flüssigkeitssubstitution wurden die Tiere nochmals kurzzeitig mit Isofluran anästhesiert, um die Katheter zu ziehen, die Femoralarterien beiderseits zu ligieren und die Haut mit einem 5-0 Ethilon Faden zu verschließen. Zur verlängerten Schmerzreduktion wurde das Lokalanästhetikum Lidocain in allen Wundbereichen aufgetragen. Im Rahmen dieses Schockmodells wurde in der Vergangenheit keine Mortalität sowie keine Komplikationen hinsichtlich der Beweglichkeit und Durchblutung der Hinterläufe (Ligatur der Femoralarterien) beobachtet.

Abb. 12

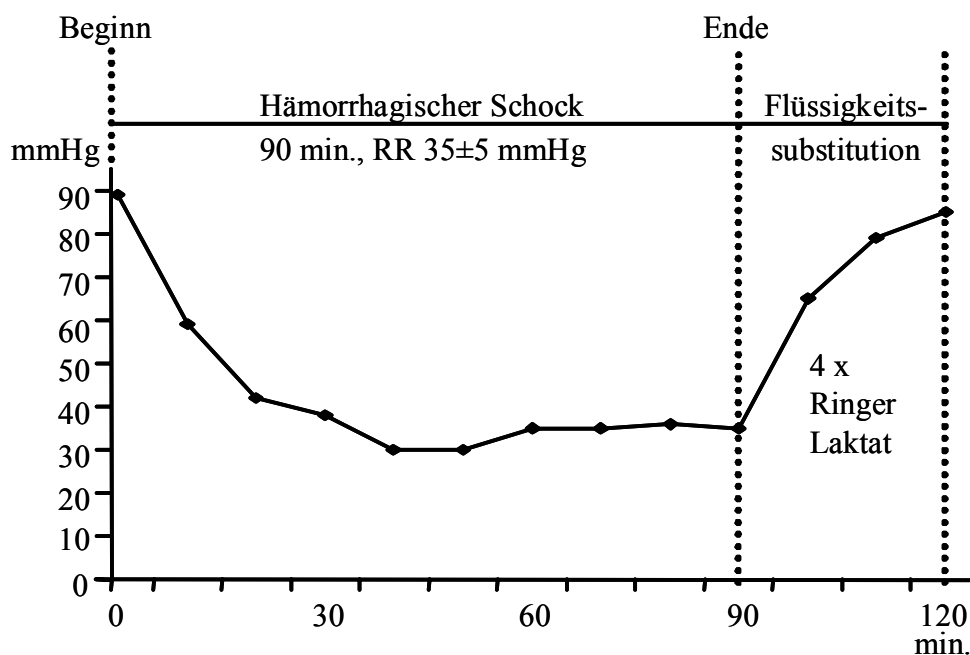


Abb. 12 Exemplarische Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer Blutdruckkurve während der Durchführung des traumatisch-hämorrhagischen Schocks und der anschließenden Flüssigkeitssubstitution.

### 3.3.3 Durchführung der Kontrolloperation

Bei allen Kontrolltieren wurden ebenfalls alle chirurgischen Interventionen unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Zunächst wurde wiederum eine Mittellinienlaparotomie und anschließend eine Hautinzision in der Leiste vorgenommen, die Femoralarterien beiderseits dargestellt und punktiert sowie Polyäthylen-10-Katheter eingelegt und schließlich die Femoralarterien ligiert. Zuletzt wurde ein Lokalanästhetikum (Lidocain) im Wundbereich aufgetragen und die Haut mit einem 5-0 Ethilon Faden verschlossen. Es wurde jedoch weder blutdruckwirksam Blut aspiriert noch im Anschluss eine Flüssigkeitssubstitution durchgeführt.

### 3.4 Reduktion der Plasmaspiegel von Testosteron - Kastration

Bei einem Teil der männlichen Versuchstiere wurde zwei Wochen vor dem Schockereignis unter sterilen Operationsbedingungen eine Kastration in Inhalationsnarkose (Isofluran) durchgeführt. Hierfür wurde das Skrotum mit 75 % Alkohol desinfiziert und nachfolgend distal mit einem 3 mm langen Schnitt eröffnet.

Der rechte und linke Hoden wurden jeweils zusammen mit den zu- und abführenden Gefäßen sowie dem Ductus deferens dargestellt. Anschließend wurden die freipräparierten Strukturen ligiert und der Hoden entfernt. Das Skrotum wurde mit einer 4-0 Ethilon Hautnaht verschlossen. Zur Schmerzlinderung wurde direkt postoperativ ein Tropfen Novalgin oral verabreicht. Dieser Eingriff war mit keiner Mortalität verbunden. Zwei Wochen nach Kastration fanden sich signifikant verringerte Testosteron-Plasmaspiegel (103).

Bei allen Kontrolltieren wurden ebenfalls alle chirurgischen Interventionen unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. So wurde das Skrotum eröffnet, aber weder wurden die freipräparierten Strukturen ligiert, noch die Hoden entfernt. Das Skrotum wurde mit einer 4-0 Ethilon Hautnaht verschlossen. Zur Schmerzlinderung wurde direkt postoperativ ein Tropfen Novalgin oral verabreicht.

### 3.5 Applikation von $5\alpha$ -Dihydrotestosteron *in vivo*

Ein Teil der Mäuse wurde nach erfolgter Kastration mit  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) über einen Zeitraum von 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock behandelt. Hierfür wurden Pellets mit 7,5 mg  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) (Innovative Research of America, Sarasota, FL) mit Hilfe eines speziellen Applikators subkutan implantiert. Das in den Pellets enthaltene Sexualhormon wurde über den gesamten Versuchszeitraum hinweg kontinuierlich ausgeschüttet (Abb. 13).

Abb. 13

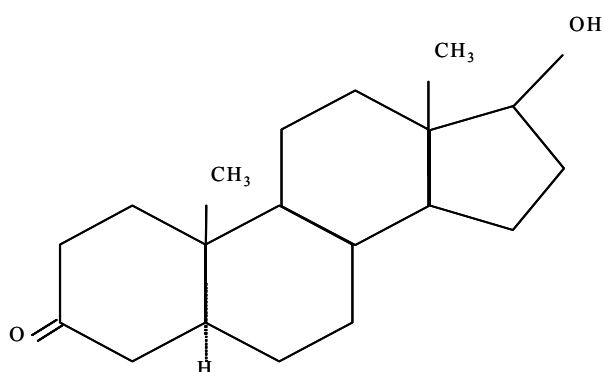


Abb. 13 Strukturformel von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron

Die  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron-Plasmaspiegel bei den mit DHT-Pellets behandelten kastrierten männlichen Mäusen waren nach 2 Wochen vergleichbar zu denen nicht kastrierter männlicher Tiere (3).

Das androgene Hormon DHT wurde verwendet, da dieses Steroid das wirksamste männliche Sexualhormon darstellt. Zusätzlich handelt es sich hierbei um das Endprodukt in der Steroidhormonsynthese, das zu keinem anderen wirksamen Metaboliten abgebaut wird (Abb. 14).

Abb. 14

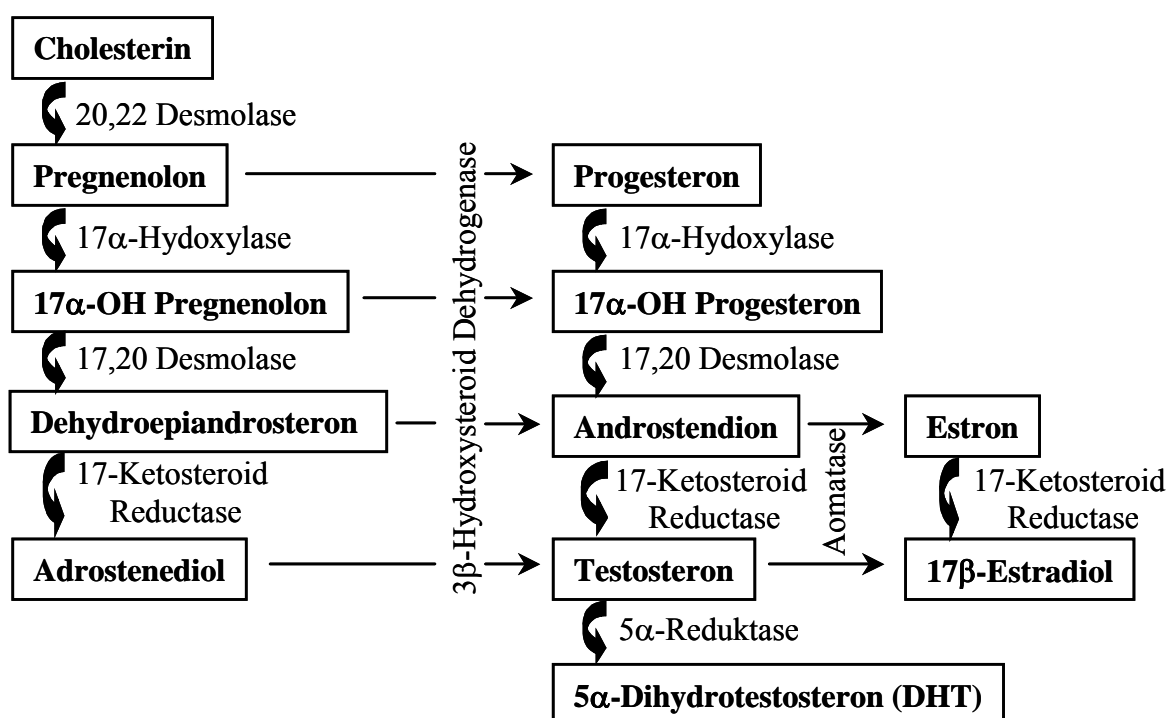


Abb. 14 Schematische Darstellung der Synthese steroidaler Sexualhormone aus Cholesterin in der Nebenniere und den Hoden bzw. den Ovarien.

Neuere Studien von Schneider et alii (*et al.*) bestätigen die Bedeutung des Androgens DHT für die Immunsuppression bei männlichen Mäusen (97). In diesen Studien wurde männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock der Aromatase-Inhibitor, 4-Hydroxyandrostenedione injiziert. Dieser hemmt sowohl die Aromatase als auch die  $5\alpha$ -Reduktase und verhindert so die Synthese von DHT (53). Die Blockierung der DHT-Synthese hatte eine Normalisierung der zellvermittelten Immunantwort und eine erhöhte Überlebensrate nach Schock und Sepsis zur Folge (97).

### 3.6 Gewinnung von Immunzellen und Gewebe – *in vitro*

#### Kulturverfahren

##### 3.6.1 Vollblut, Plasma

Nach dem Töten der Versuchstiere durch Inhalation einer Überdosis Isofluran wurde das Herz durch eine Thorakotomie dargestellt und anschließend Vollblut durch eine kardiale, linksventrikuläre Punktion gewonnen. Durch Zentrifugation bei 4 Grad Celsius (°C) und  $320 \times g$  für die Dauer von 20 min. in vorgekühlten EDTA-Röhrchen (Microtainer, Becton Dickinson and Co., Rutherford NJ) wurde das Plasma separiert, zellfrei aspiriert und anschließend sofort tief gefroren. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -70 °C gelagert.

##### 3.6.2 Wundimmunzellen

Aus den toten Versuchstieren wurden die subkutan eingebrachten Polyvinylschwämmchen unter sterilen Bedingungen entfernt und anschließend die Wundimmunzellen durch mehrmaliges Auswaschen der Polyvinylschwämmchen mit eiskalter PBS-Lösung (Gibco, Grand Island, NY) und Zentrifugation bei 4 °C und  $320 \times g$  für die Dauer von 15 min. isoliert. Daraufhin wurden die so gewonnenen Wundimmunzellen nach Ethylenblau-Färbung in einer Hartmann Kammer hinsichtlich Anzahl, Viabilität und Zelltyp untersucht und auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI Kulturmedium eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in 24 Well Platten ausgebracht. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch 24-stündige Inkubation bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) und 90 % Luftfeuchtigkeit mit Lipopolysaccharid (LPS) 10 Mikrogramm/ml (µg/ml) (aus E. coli 055:B5; Difco Labs Detroit, MI) stimuliert (Abb. 15). Diese Stimulation gewährleistete eine maximale Aktivierung der Wundimmunzellen und erlaubte so einen Rückschluss auf den immunologischen Status dieser Zellen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die zellfreien Überstände gewonnen und bis zur weiteren Analyse der Zytokinspiegel bei -70 °C eingefroren.

Abb. 15

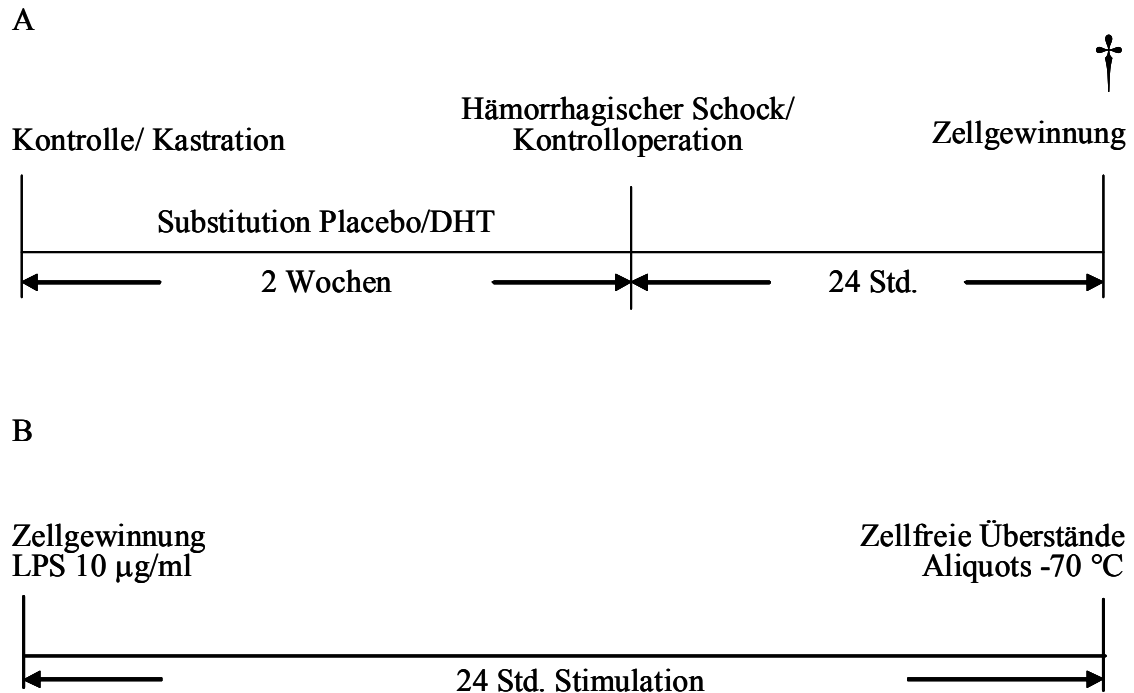


Abb. 15 A; Schematische Darstellung des Versuchsablaufes für Studien, die den Einfluss von Testosteron auf die Funktion der Wundimmunzellen und auf die Wundheilung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock untersuchten. Für diese Studien wurden männliche Mäuse verwendet. B; Schematische Darstellung der anschließend durchgeführten *in vitro* Stimulation der gewonnenen Wundimmunzellen.

### 3.6.3 Gewinnung von Wundhaut

Zur Gewinnung der Wundhaut wurden zunächst durch Rasur die Haare entfernt und ein 0,5 cm × 1,5 cm großes Hautstück um die Laparotomiewunde isoliert. Das so gewonnene Hautstück wurde in 10 % Formalin aufbewahrt. Die in Formalin fixierte Haut wurde in Paraffin eingebettet und im Anschluss immunhistochemisch aufgearbeitet.

### 3.6.4 Milzmakrophagen

Nach aseptischer Entnahme der Milz wurden Milzzellen durch vorsichtiges Zerreiben des Organs zwischen zwei Objektträgern über einer Petrischale mit eiskalter



Phosphate buffered saline (PBS)-Lösung (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gewonnen. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und  $320 \times g$  für die Dauer von 15 min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer eiskalten PBS-Lösung resuspendiert.

Abb. 16

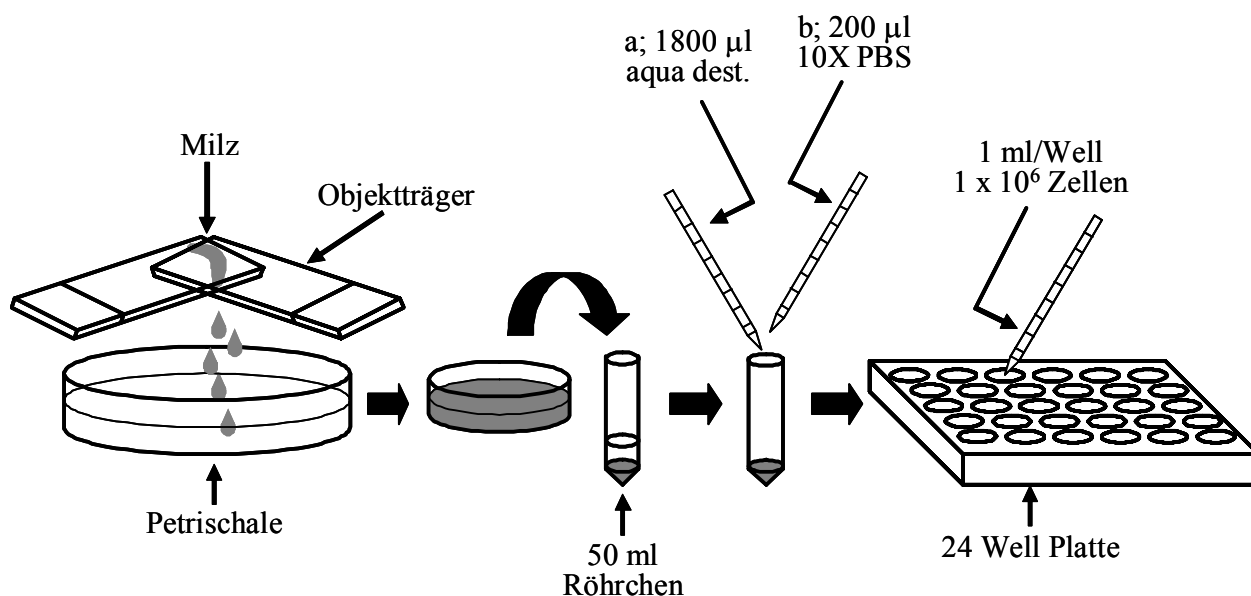


Abb. 16 Schematische Darstellung der Gewinnung von Makrophagen aus der Milz nach aseptischer Organentnahme und der anschließenden Verarbeitung der Zellsuspension zur Separierung und Stimulation der Makrophagen.

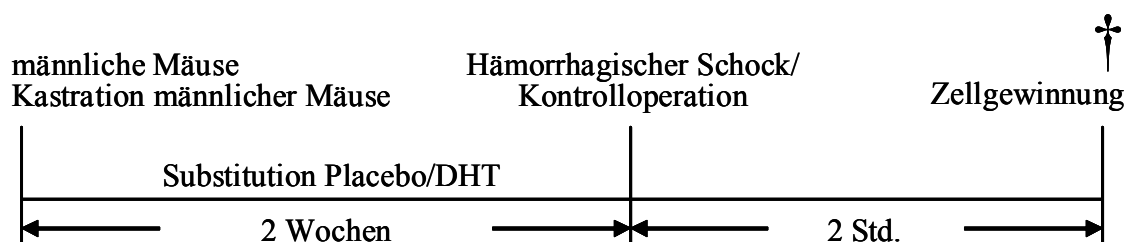
Die in der Suspension vorhandenen Erythrozyten wurden in sterilem Wasser (hypoton im Vergleich zum Zellinneren) lysiert. Die Lyse wurde nach 7 Sekunden (sek.) durch Zugabe von 10 x PBS (hyperton) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gestoppt. Die so entstandenen Erythrozytenfragmente konnten durch Adhäsion an einer Glaspipette aus der Zellsuspension entfernt werden (Abb. 16).

Die Makrophagen wurden aus der Zellsuspension der Milz durch ihre Fähigkeit zur Adhäsion an 24-Well Kulturplatten isoliert. Hierzu wurden die Zellen für die Dauer von 2 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die am Boden der Platte anhaftenden Makrophagen durch wiederholtes, vorsichtiges Auswaschen der nicht adhären Zellen isoliert. Der so erhaltene Monolayer bestand aus  $1 \times 10^6$  Makrophagen pro Well und wurde durch 20 minütige Inkubation mit LPS 10 µg/ml (aus E. coli 055:B5; Difco Labs Detroit, MI) stimuliert (Abb. 17). Diese Stimulation gewährleistete eine maximale Aktivierung der Makrophagen und erlaubte so einen

Rückschluss auf den Status der Zellen hinsichtlich ihrer Immunkompetenz. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Überstände entfernt, die verbliebenen Zell-Monolayer mit RIPA Puffer lysiert und das Lysat anschließend bis zur weiteren Bestimmung durch Western Blot Analyse bei -70 °C eingefroren.

Abb. 17

A



B

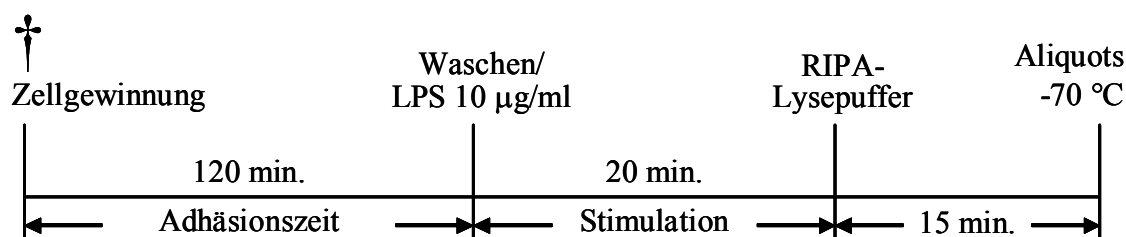


Abb. 17 A; Schematische Darstellung des Versuchsablaufes für Studien, die den Einfluss des Geschlechts auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase nach traumatisch-hämorrhagischem Schock untersuchten. Für diese Studien wurden männliche Mäuse verwendet. B; Schematische Darstellung der anschließend durchgeführten in vitro Verfahren zur Stimulation der gewonnenen Milz- und Peritonealmakrophagen sowie anschließenden Lyse zur Proteingewinnung.

### 3.6.5 Peritonealmakrophagen

Entsprechend der von Ayala *et al.* (16) beschriebenen Methode wurden die Peritonealmakrophagen isoliert. Diese wurden durch zweimalige Peritoneallavage mit 5 ml eiskalter PBS-Lösung (Gibco, Grand Island, NY) aus dem Abdomen der Tiere gewonnen. Durch eine 15-minütige Zentrifugation mit  $320 \times g$  bei 4 °C erfolgte die Isolation der zellulären Fraktion. Die Peritonealmakrophagen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml Click's-Medium (Irvine Sci., Santa Ana, CA)

resuspendiert, davon wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension auf eine Kulturplatte gebracht und für die Dauer von 2 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Abb 17).

Die Isolation der am Boden der Kulturplatten anhaftenden Peritonealmakrophagen erfolgte durch wiederholtes, vorsichtiges Waschen zur Entfernung nicht adhärenter Zellen. Der so erhaltene Monolayer wurde durch 20 minütige Inkubation mit LPS 10 µg/ml (aus *E. coli* 055:B5; Difco Labs Detroit, MI) stimuliert. Diese Stimulation gewährleistete eine maximale Aktivierung der Makrophagen und erlaubte so einen Rückschluss auf den immunologischen Status der Immunzellen. Nach 20 minütiger Inkubation der Peritonealmakrophagen wurden die Überstände entfernt, die verbliebenen Zell-Monolayer mit RIPA Puffer lysiert und das Lysat anschließend bis zur weiteren Bestimmung durch Western Blot Analyse bei -70 °C eingefroren.

### 3.7 Bestimmung der Steroidhormon-Plasmaspiegel mittels

#### Radioimmunassay

Die 5α-Dihydrotestosteron-Plasmaspiegel wurden mittels eines Radioimmunassays der Firma Diagnostic Systems Laboratories, Inc (Webster, TX) gemessen. Zur Bestimmung wurden 100 Mikroliter (µl) Plasma in mit Antikörpern überzogene Gefäße überführt. Alle Proben wurden in Duplikaten untersucht. Die Kreuzreaktivität für DHT beträgt 100 %. Hierbei wurde die prozentuale Kreuzreaktivität als Verhältnis der Testosteronkonzentration zur Konzentration der reagierenden Substanz, hier Testosteron, bei 50 %iger Bindung des Nullstandards angegeben. Die DHT-Konzentrationen in den Proben wurden durch Interpolation gegen eine DHT-Standardkurve ermittelt. Die niedrigste, nachweisbare DHT-Konzentration betrug 4 Pikogramm/ml (pg/ml).

### 3.8 Zytokinbestimmung in den Zellüberständen

#### 3.8.1 Bestimmung von IL-1β und IL-6 mittels ELISA

In einem Teil der Versuche wurden die IL-1β und IL-6 Konzentrationen in den Überständen, wie zuvor von Chaudry *et al.* beschrieben, mittels Sandwich-Enzyme

Linked Immunoassay (ELISA) bestimmt (29). Zur Durchführung wurden 96-Well Kulturplatten (Nunc-Immuno Maxisorp, Inter-Med/Nunc VWR-Scientific, Batavia, IL) über Nacht bei 4 °C mit 2.0 µg/ml eines monoklonalen Hamster Anti-Maus IL-1β Antikörpers (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA) oder 2 µg monoklonalen Hamster Anti-Maus IL-6 Antikörpers (R&D Systems) /ml von 0.1 molar (M) Carbonat, pH 8,2, inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Proben und der Standard (1000 pg/ml rekombinantes Maus IL-1β, Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA) bzw. 3000 pg/ml Maus IL-6 (R&D Systems) aufgetragen und nochmals bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die Platten wurden nach mehrmaligem Waschen für 1 Std. bei 37 °C mit einem biotinylierten, polyklonalen Kaninchen Anti-Maus IL-1β Antikörper (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA) in einer Konzentration von 0,8 µg/ml oder mit biotinylierten, polyklonalen Kaninchen Anti-Maus IL-6 Antikörpern (R&D Systems) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden nochmals gereinigt und Horseradish Peroxidase für 15 min. bei 37 °C hinzugefügt. Nach mehrmaligem Waschen wurden 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) in jedes Well pipettiert. Dadurch wurde eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität mit der Menge von IL-1β bzw. IL-6 korreliert. Die Absorption wurde bei 655 Nanometern (nm) mit einem Mikroplatten-Lesegerät (EL-311, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) erfasst. Die Konzentration an IL-1β und IL-6 wurde mit Hilfe der Standardkurve aus Maus IL-1β und IL-6 ermittelt und werden mit der Einheit pg/ml angegeben.

### 3.9 Immunhistochemie

Das Gewebe wurde nach Gewinnung in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mittels eines Microtoms (Microm) wurden Schnitte von 1-2 Mikrometer (µm) Dicke angefertigt. Zur immunhistochemischen Bestimmung von IL-6 im Gewebe wurden Avidin-Biotin-Komplexe verwendet. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit primärem, polyklonalen Ziege IL-6 Anti-Maus Antikörper (R&D Systems) in einer Verdünnung von 1:200 für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde ein biotinylierter Anti-Ziege Antikörper (Dianova, Hamburg) mit einer Verdünnung von 1:4000 für 30 min. bei

Raumtemperatur hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase konjugiertem Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min. bei Raumtemperatur. 3'-amino-9'-ethyl carbazole (Sigma Chemicals) wurde nachfolgend für 8 min. hinzugefügt, um eine Farbreaktion auszulösen. Die Objektträger wurden von zwei unabhängigen Personen doppelblind ausgewertet.

### 3.10 Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut

Zur Untersuchung der Reißfestigkeit wurden die Tiere am 10. Tag nach Trauma und hämorrhagischem Schock mittels einer Überdosis Isofluran Inhalationsnarkose getötet. Im Anschluss wurden in einem definierten Abstand von 1 cm parallel zur Wunde verlaufende Linien auf die Haut aufgetragen. Entlang dieser Vorgaben wurde schließlich ein Haut-Muskelpräparat gewonnen. Zur Standardisierung des Versuches wurde dieses Präparat mittels einer Schablone in exakt 1 cm breite sowie ca. 3 cm lange Streifen unterteilt. Die Dicke dieser Präparate betrug ungefähr 2 mm. Die so gewonnenen Wundpräparate wurden auf Eis in den Untersuchungsraum gebracht. Jedes einzelne Präparat wurde anschließend sofort in die in Abb. 18 beschriebene Testapparatur eingespannt. Hierfür wurden die Präparate an den zuvor markierten Abstandslinien in die vorgesehenen Klemmvorrichtungen eingespannt (Abb. 18). Dies wurde unter spannungsfreien Bedingungen vorgenommen. Nach der Fixierung wurde die Wundhaut mit einer Vorspannung von 0,5 Newton (N) gedehnt, so dass sie die Ausgangslänge von 2 cm erreichte. Jede Gewebeprobe wurde mit einer Kraftzunahme von 2 mm/sek. sowie bis zu einem Maximum von 30 mm untersucht. Es wurden die Dehnungskurven und die maximale Reißfestigkeit bestimmt. Diese wurden graphisch in einem Diagramm aufgezeichnet.

Abb. 18

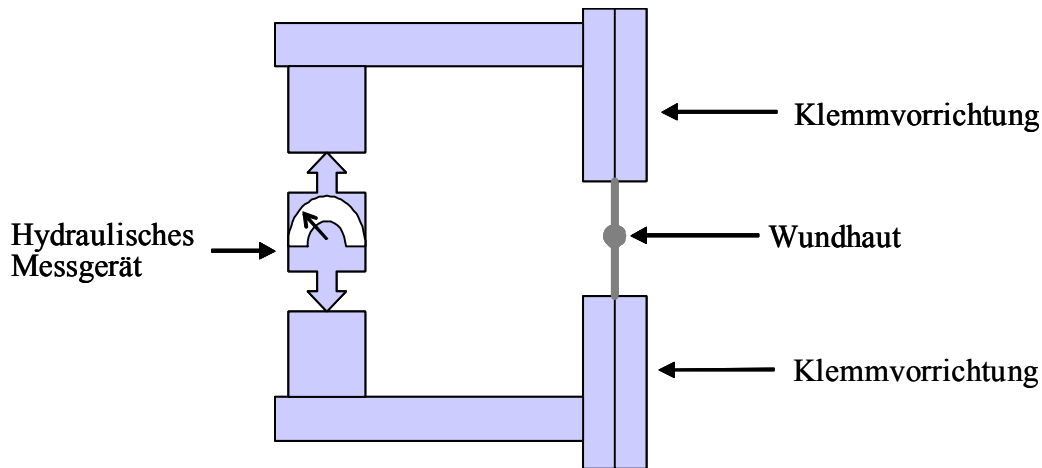


Abb. 18 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut.

### 3.11 Western Blot Analyse

Zur Bestimmung der Aktivierung der p38 MAP-Kinase wurde der zuvor beschriebene Monolayer aus Milz- und Peritonealmakrophagen für 20 min. mit 10 µg/ml LPS (aus *E. coli* 055:B5; Difco Labs Detroit, MI) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit stimuliert. Anschließend wurden die Milz- und Peritonealmakrophagen zur Proteingewinnung mit RIPA Puffer lysiert. Zur Herstellung des RIPA Puffers wurde zunächst folgende Lösung hergestellt: 100 millimolar (mM) Tris HCL (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Deoxycholsäure, 1 % Triton und 0,1 % Sodium Dodecyl Sulfate. Dieser Lösung wurden kurz vor Verwendung des Puffers 0,1 ml 100 mM Phenylmethylsulfonylfluoride, 0,25 ml 1 M NaF Lösung, 0,05 ml 250 mM Sodiumvenadat, 0,2 ml von 25 × Proteinaseinhibitor (Böhringer Mannheim GmbH, Mannheim) zugesetzt. 100 µl dieses Puffers wurden zur Lysierung von  $5 \times 10^6$  Immunzellen verwendet.

Unter Verwendung eines BioRad Protein-Kits (BioRad, Life Science Group, CA, USA) wurde zunächst die Gesamtproteinmenge im Zell-Lysat ermittelt. Die Proben wurden durch jeweilige Zugabe von Running Buffer (50 ml Running Buffer, NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA und 950 ml Aqua dest.) auf einen Wert von

15 µg Protein pro Slot verdünnt. Anschließend wurden 4,5 µl Sample Buffer (NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) und 4,0 µl Reducing Agent (NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) hinzu gefügt. Die angesetzten Proben wurden für 3 min. in einem Wasserbad erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. In die vorgestanzten Slots des Minigeles (NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) wurden 20 µl der erstellten Probensuspension blasenfrei eingebracht, und anschließend in einer Mini-Gel-Kammer (NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) in Running Buffer (NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) bei 125 Volt (V), 35 Milliampere (mA), und 5,0 Watt (W) für 1,5 Std. separiert.

Das Gel wurde nach Abschluss der Gelelektrophorese aus der Halterung auf eine Nylonmembran (Novex, Invitrogen, Carlsbad, CA) aufgetragen. Die zu blottenden Membranen wurden entsprechend in Filterkissen eingebettet und in Transfer Buffer (760 ml Aqua dest., 200 ml Methanol und 40 ml Transfer Buffer, NuPAGE, Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) bei 25 V, 125 mA, für eine Std. geblottet.

Nach Abschluss der Übertragung wurde die Nylonmembran mit einer Milchpulverlösung (2,5 g Milchpulver in 50 ml PBS mit 0,1 % Tween) für eine Std. geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je 20 min. wurde zunächst entweder der anti-p38 oder anti-p38P primäre Rabbit-Antikörper (Calbiochem, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS für 1,5 Std. (30 min. bei Raumtemperatur und 60 min. bei 37 °C) zugegeben. Nach einem erneuten dreimaligen Waschen der Nylonmembran mit PBS-T für jeweils 20 min. wurde mit einem sekundären, Biotin-Horse-Radish POX konjugiertem anti-Rabbit Antikörper (Emission Chemiluminescence Kit, Amersham Lifescience, England) 1:1000 in PBS verdünnt für 1,5 Std. inkubiert. Nach Auswaschen der Antikörper für mindestens dreimal 20 min. in PBS-T wurden die beiden Emission Chemiluminescence Reagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1 : 1 gemischt und der Blot für 60 sek. in dieser Lösung inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt, und der Blot in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend erfolgte die Exposition auf einen Röntgenfilm für die Dauer von 20 bis zu 90 sek. Dieser Röntgenfilm wurde in der Radiologischen Abteilung des Klinikum Großhadern entwickelt.

Die weitere Auswertung der Western Blot Analyse erfolgte anhand des Programms SigmaGel im Institut für Chirurgische Forschung. Hierfür wurden die Röntgenfilme mit einer Digitalkamera aufgenommen. Anschließend wurden die Proteinbanden markiert und die Intensität bestimmt. Dieser Wert wurde mit der Fläche

der entsprechenden Proteinbanden multipliziert. Auf diese Weise errechnete sich indirekt der qualitative Wert der Intensität der Chemilumineszenz der Proteinbanden. Die hierbei gewonnenen Werte bildeten die Grundlage der weiteren statistischen Auswertung.

### 3.12 Statistik

Für alle statistischen Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als signifikant angenommen. Die Datenanalyse des Effektes von Sexualhormonen auf Funktionsparameter von Immunzellen, z.B. die Zytokinsekretion *in vitro* wurde mit One-Way ANOVA mit Student-Newman-Keuls als post-hoc Test oder ANOVA on Ranks durchgeführt. Die Daten waren normal verteilt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 $5\alpha$ -Dihydrotestosteronspiegel nach Kastration und Placebo- oder Hormonsubstitution

In den kastrierten Mäusen, denen nur Placebo verabreicht worden war, fanden sich verglichen mit normalen männlichen Mäusen signifikant erniedrigte Plasmaspiegel von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT). Die Implantation von DHT-Pellets führte zu physiologischen Testosteronplasmaspiegeln wie sie männlichen Versuchstieren zu beobachten sind. Die Substitution mit DHT erfolgte für die Untersuchungen zur Aktivierung des Signaltransduktionsmechanismus p38. Zwischen den vergleichbaren tierexperimentellen Gruppen, die entweder einer Kontrolloperation unterzogen oder die einem traumatisch-hämorrhagischem Schock ausgesetzt wurden, ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Androgen-Plasmaspiegel nachweisen (Tab. 1).

Tab. 1

Kontrolle / Placebo	Schock / Placebo	Kontrolle / DHT	Schock / DHT
99,7 $\pm$ 6,0	84,1 $\pm$ 5,7	2567 $\pm$ 145 *	2103 $\pm$ 279 *

Tab. 1, C3H/HeN Mäuse wurden 2 Wochen vor Kontrolloperation (Kontrolle) oder hämorrhagischem Schock (Schock) kastriert und gleichzeitig mit Placebo oder DHT behandelt. Testosteron-Plasmaspiegel (pg/ml) wurden mittels Radioimmunoassay 24 Std. nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bestimmt. n=6 Tiere/Gruppe. \*p<0.05 DHT behandelte Mäuse vs. Placebo Behandlung. Eine signifikante Differenz der beiden Placebo behandelten Gruppen lies sich nicht nachweisen.

### 4.2 Einfluss von Testosteron auf die Wunde

#### 4.2.1 Auswirkung von Testosteron auf die Wundimmunzellfunktion *in vitro*

Zur Charakterisierung der lokalen Immunreaktion wurde *in vitro* die Funktion von Wundimmunzellen nach hämorrhagischem Schock untersucht. Hierzu waren männliche Mäuse 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock kastriert oder schein-kastriert worden. Wundimmunzellen normaler männlicher Mäuse aus dem Bereich der Laparotomiewunde zeigten am 1. postoperativen Tag nach

hämorrhagischem Schock eine signifikant verringerte Sekretion von IL-1 und IL-6 nach Stimulation mit LPS *in vitro*. Im Gegensatz zu schein-kastrierten Tieren war bei 2 Wochen zuvor kastrierten Tieren eine Unterdrückung der IL-1 $\beta$  und IL-6 Sekretion durch Wundimmunzellen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und *in vitro* Stimulation nicht nachweisbar (Abb. 19). Die Verringerung der Testosteron-Plasmaspiegel durch Kastration hatte jedoch keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$  und IL-6 Sekretion durch Wundimmunzellen von Tieren, die einer Kontrolloperation unterzogen worden waren.

Abb. 19

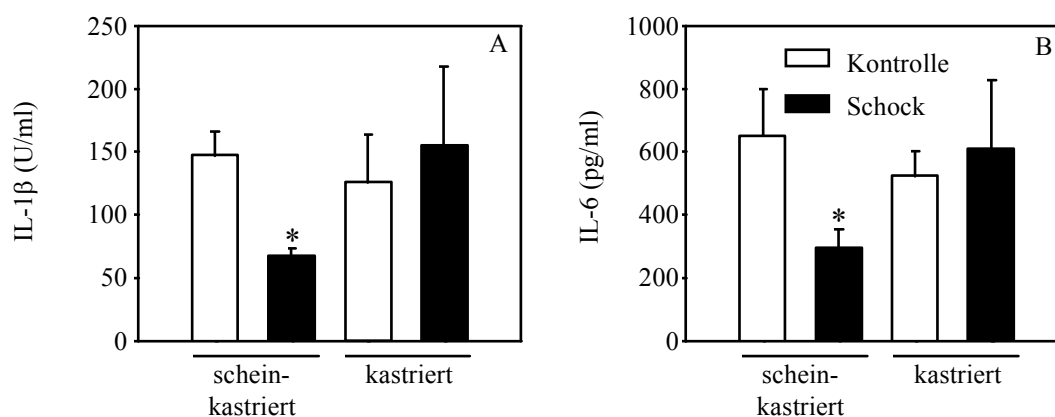


Abb. 19 C3H HeN Mäuse wurden 2 Wochen vor hämorrhagischem Schock kastriert oder schein-kastriert. 24 Std. nach hämorrhagischem Schock wurden Wundimmunzellen aus dem Bereich der Laparotomiewunde gewonnen und die Sekretion von IL-1 $\beta$  (A) und IL-6 (B) nach Stimulation mit LPS *in vitro* in den Überständen durch ELISA bestimmt. n=6 Tiere/Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle

Die signifikante Reduktion der zirkulierenden Testosteron-Plasmaspiegel bei kastrierten Tieren (-96,1 % im Vergleich zu schein-kastrierten Tieren) hatte zur Folge, dass die sonst zu beobachtende Unterdrückung der LPS induzierten Sekretion der proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-6 *in vitro* durch Wundimmunzellen 24 Std. nach traumatisch-hämorrhagischem Schock nicht nachweisbar war. Die Reduktion der Testosteron-Plasmaspiegel bei kastrierten Tieren hatte keinen Einfluss auf die Zytokinsekretionsfähigkeit durch Wundimmunzellen bei Kontrolltieren.

#### 4.2.2 Quantitative und qualitative Analyse der Wundimmunzellen

Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Zusammensetzung der Wundimmunzellen sowie die Anzahl der gewonnen Immunzellen weder durch den

Schock noch durch die Kastration signifikant beeinflusst wurden (Tab. 2). Diese Daten zeigen, dass die Kastration männlicher Mäuse zu einer Verbesserung der Synthesefähigkeit der Wundimmunzellen *in vitro* nach hämorrhagischem Schock führt und die signifikanten Unterschiede nicht durch eine veränderte Zellzusammensetzung im Wundbereich bedingt sind.

Tab. 2

	Gesamtzahl	Verteilung	
	( $1 \times 10^6$ cells)	Mφ (%)	PMN (%)
<b>Kontrolle</b>	$6,7 \pm 0,8$	$9.9 \pm 1.0$	$90.1 \pm 1.1$
<b>Kontrolle/Kastration</b>	$7,4 \pm 1,7$	$7.8 \pm 1,9$	$92.2 \pm 1.0$
<b>Schock</b>	$9,7 \pm 2,5$	$7.0 \pm 0.9$	$93.0 \pm 0.9$
<b>Schock / Kastration</b>	$10,5 \pm 1,5$	$7.5 \pm 1.3$	$92.5 \pm 1.3$

Tab. 2, C3H HeN Mäuse wurden 2 Wochen vor hämorrhagischem Schock (Schock) kastriert oder schein-kastriert. 24 Std. nach hämorrhagischem Schock wurden Wundimmunzellen aus dem Bereich der Laparotomiewunde gewonnen und die Gesamtzahl sowie die Zusammensetzung der Immunzellen bestimmt.

#### 4.2.3 Auswirkungen von Testosteron auf die *in vivo* IL-6 Ausschüttung im Bereich der Laparotomiewunde

Um die Auswirkungen von Testosteron auf die lokale Immunantwort zu untersuchen, wurde bei kastrierten und schein-kastrierten Tieren die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen im Wundbereich ermittelt. Im Gegensatz zu der verminderten Sekretion von IL-6 durch Wundimmunzellen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock *in vitro*, konnte *in vivo* unter solchen Bedingungen eine erhöhte Ausschüttung von IL-6 im Bereich der Laparotomiewunde immunhistochemisch nachgewiesen werden. So zeigte sich insbesondere im Bereich der Subkutis eine erhöhte Konzentration von IL-6. Die Kastration männlicher Tiere 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock führte zu einer deutlichen Reduktion der *in vivo* Ausschüttung von IL-6 (Abb. 20).

Abb. 20

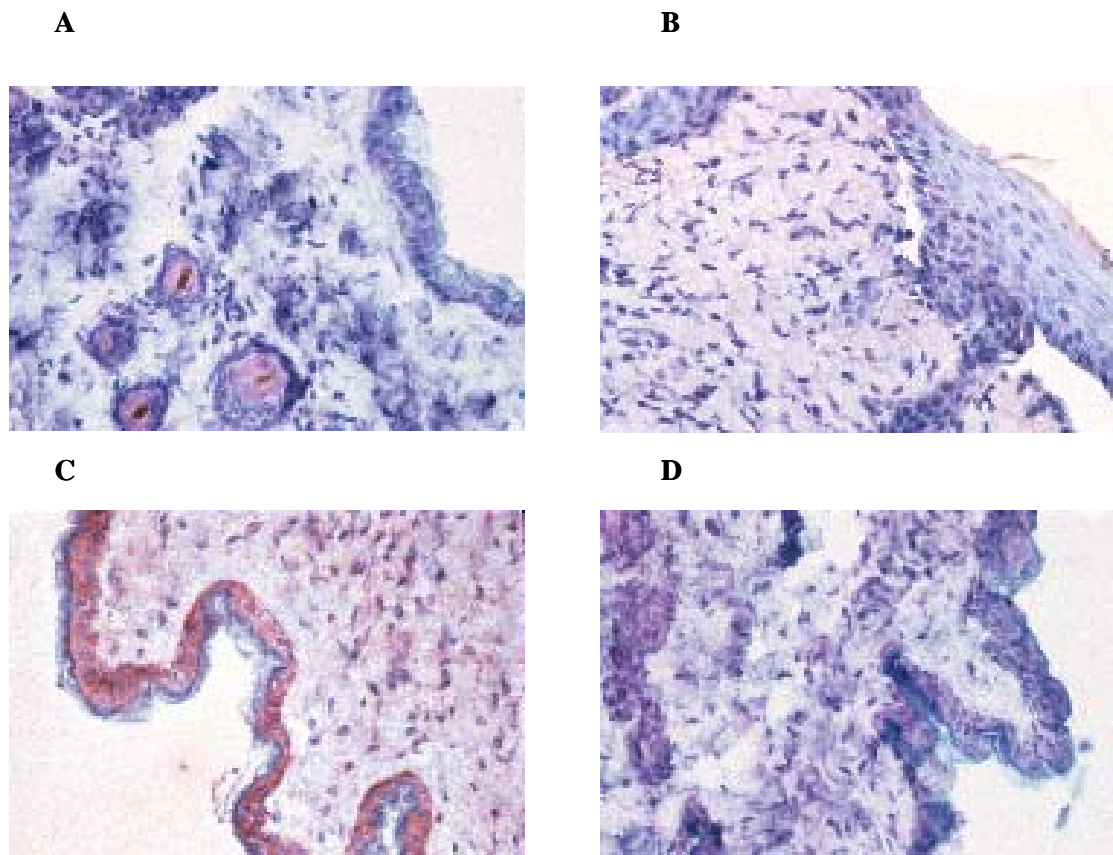


Abb. 20 C3H HeN Mäuse wurden 2 Wochen vor hämorrhagischem Schock kastriert (B; D) oder schein-kastriert (A, C). 24 Std. nach hämorrhagischem Schock (C; D) oder Kontrolloperation (A; B) wurde die Bauchwand im Bereich der Laparotomiewunde gewonnen und die Ausschüttung von IL-6 mittels Immunhistochemie nachgewiesen.

#### 4.2.4 Auswirkung von Testosteron auf die Reißfestigkeit der Wundhaut

Um die mechanischen Auswirkungen von Testosteron auf die lokale Wundheilung zu untersuchen, wurde bei kastrierten und schein-kastrierten Tieren die Reißfestigkeit im Wundbereich ermittelt. Im Gegensatz zu der verminderten Festigkeit der Wundhaut nach traumatisch-hämorrhagischem Schock in normalen männlichen Tieren (Abb. 21, 22), konnte eine erhöhte Reißfestigkeit der Wundhaut bei kastrierten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 23). Die Kastration männlicher Tiere 2 Wochen vor traumatisch-hämorrhagischem Schock führte somit zu einer deutlich erhöhten Widerstandskraft im Bereich der Laparotomiewunde nach hämorrhagischem Schock (Abb. 24).

Abb. 21

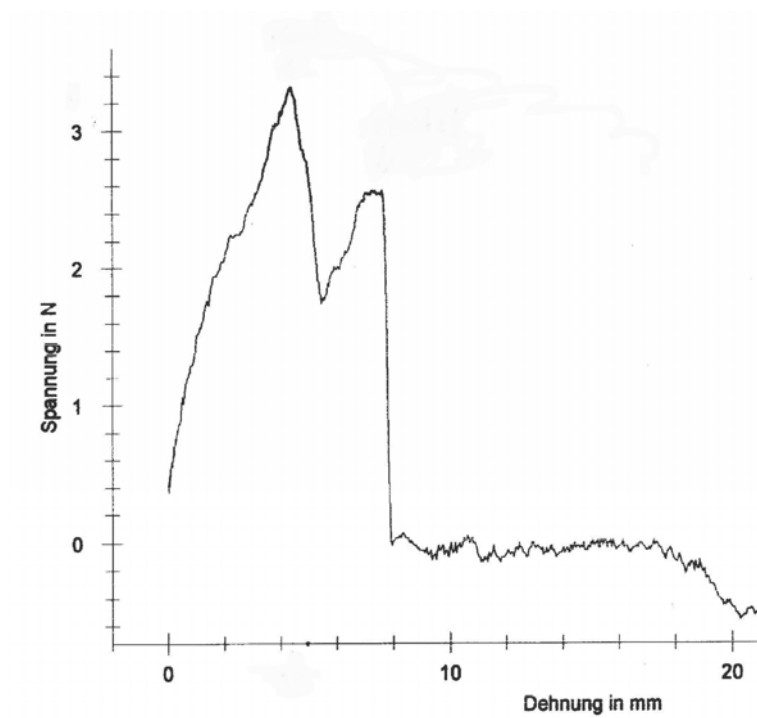


Abb. 21 Exemplarische Darstellung eines Kurvenverlaufs zur Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut einer normalen C3HeN Maus am 10. Tag nach Kontrolloperation.

Abb. 22

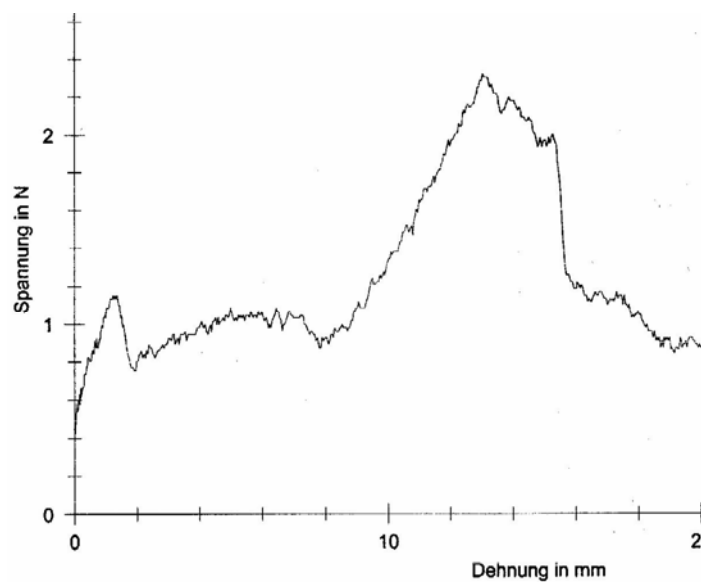


Abb. 22 Exemplarische Darstellung eines Kurvenverlaufs zur Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut einer normalen C3HeN Maus am 10. Tag nach traumatisch-hämorrhagischem Schock.

Abb. 23

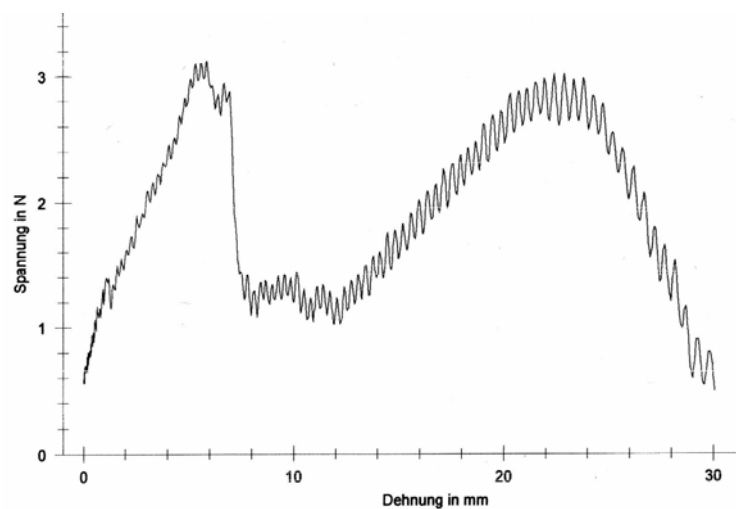


Abb. 23 Exemplarische Darstellung eines Kurvenverlaufs zur Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut einer 2 Wochen vor Trauma und Schock kastrierten C3HeN Maus am 10. Tag nach traumatisch-hämorrhagischem Schock.

Abb. 24

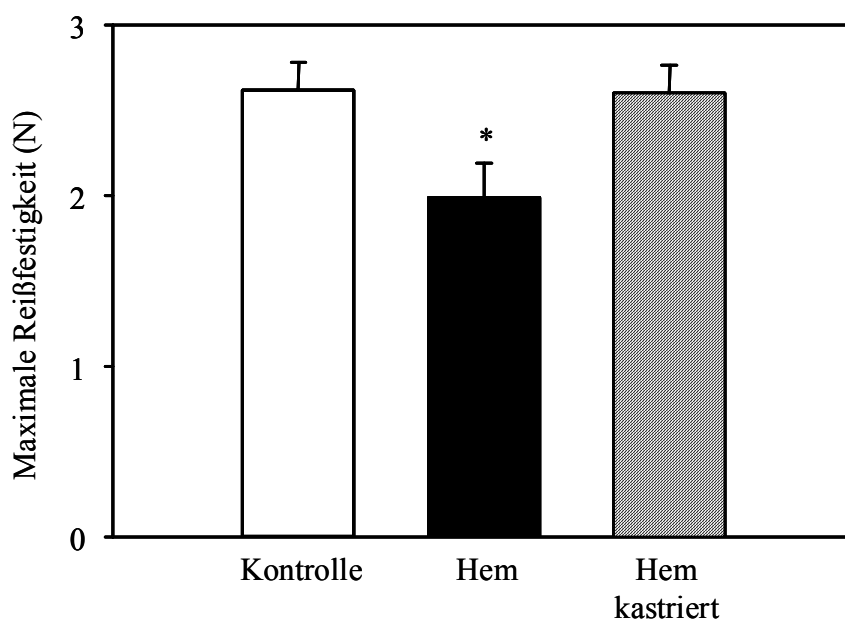


Abb. 24 C3H HeN Mäuse wurden 2 Wochen vor hämorrhagischem Schock kastriert oder schein-kastriert. 10 Tage nach hämorrhagischem Schock wurde die Wundhaut der Laparotomie gewonnen und die maximale Reißfestigkeit in N bestimmt.  $n=6$  Tiere/Gruppe. \* $p<0,05$  vs. Kontrolle

### 4.3 Einfluss von männlichen Sexualhormonen auf die Aktivierung des p38 MAP-Kinase Signaltransduktionsmechanismus

#### 4.3.1 Auswirkung von Kastration auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase

Um zu untersuchen, ob männliche Sexualhormone für die beobachtete geschlechtsspezifische p38 MAP-Kinase-Aktivierung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verantwortlich sind, wurde die Aktivierung von p38 MAP-Kinase nach traumatisch-hämorrhagischem Schock bei kastrierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die bei männlichen Tieren zu beobachtende erhöhte Phosphorylierung von p38 nach traumatisch-hämorrhagischem Schock in Milz- und Peritonealmakrophagen von kastrierten Tieren nicht mehr nachweisbar war (Abb. 25). Die Expression der nicht aktivierten Form von p38 wurde weder durch das Geschlecht noch durch den traumatisch-hämorrhagischen Schock beeinflusst.

Abb. 25

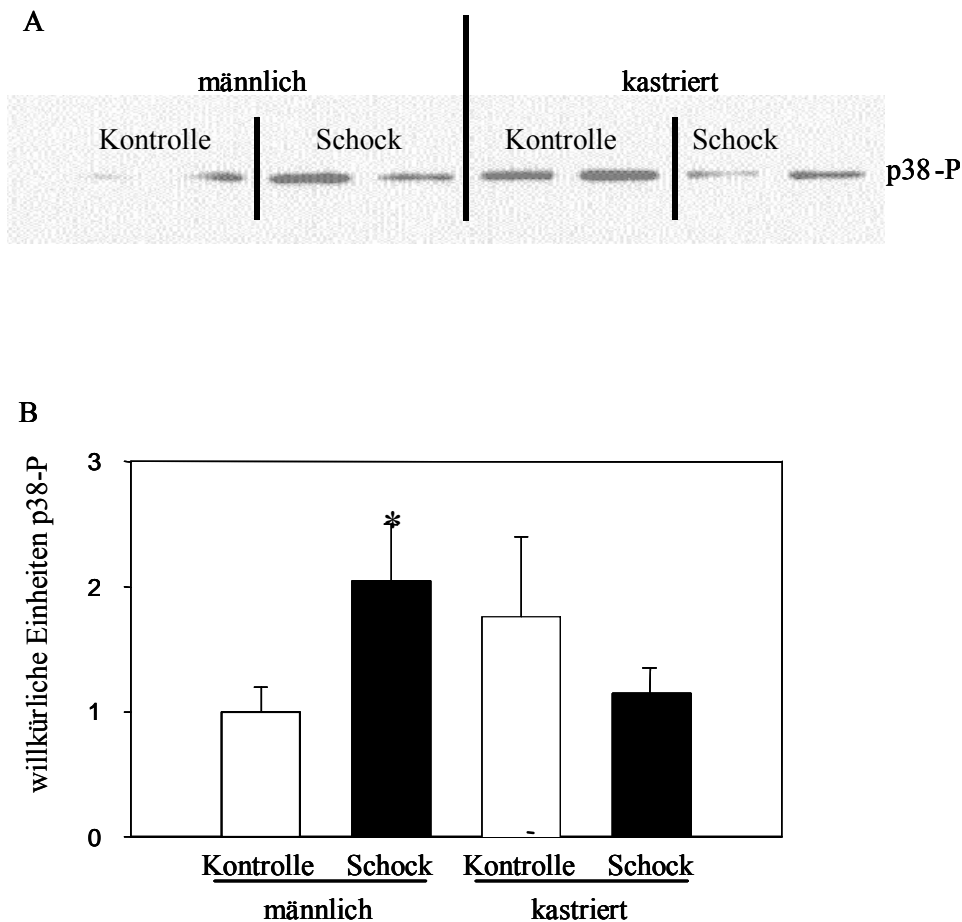


Abb. 25 Die Expression von p38 und phosphoryliertem (P) p38 Protein aus Milzmakrophagen bei männlichen (männlich) und kastrierten (kastriert) Mäusen nach Kontrolloperation (Kontrolle) und nach traumatisch-hämorrhagischem Schock (Schock) nachgewiesen mit Western Blot Analyse. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot (A) und die willkürlichen Einheiten.  $n=6$  Tiere/Gruppe. \* $p<0,05$  vs. Kontrolle (B).

#### 4.3.2 Die Auswirkung einer Testosteron-Substitution auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase

Um den direkten Einfluss des männlichen Sexualhormons Testosteron auf die geschlechtsspezifische p38 MAP-Kinase Aktivierung nachzuweisen, wurde die Aktivierung von p38 MAP-Kinase bei kastrierten Tieren ermittelt, die mit DHT oder Placebo substituiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass erneut die in normalen männlichen Tieren zu beobachtende erhöhte Phosphorylierung von p38 nach traumatisch-hämorrhagischem Schock in Milz- und Peritonealmakrophagen von kastrierten Tieren nicht nachweisbar war. Die Behandlung zuvor kastrierter Mäuse mit



DHT-Pellets für die Dauer von 2 Wochen hatte eine erneute Zunahme der Aktivierung von p38 nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zur Folge, wie sie in normalen Mäusen beobachtet wird (Abb. 27). Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass das männliche Sexualhormon DHT in männlichen Mäusen für eine erhöhte p38 MAP-Kinase Aktivierung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verantwortlich ist.

Abb. 26

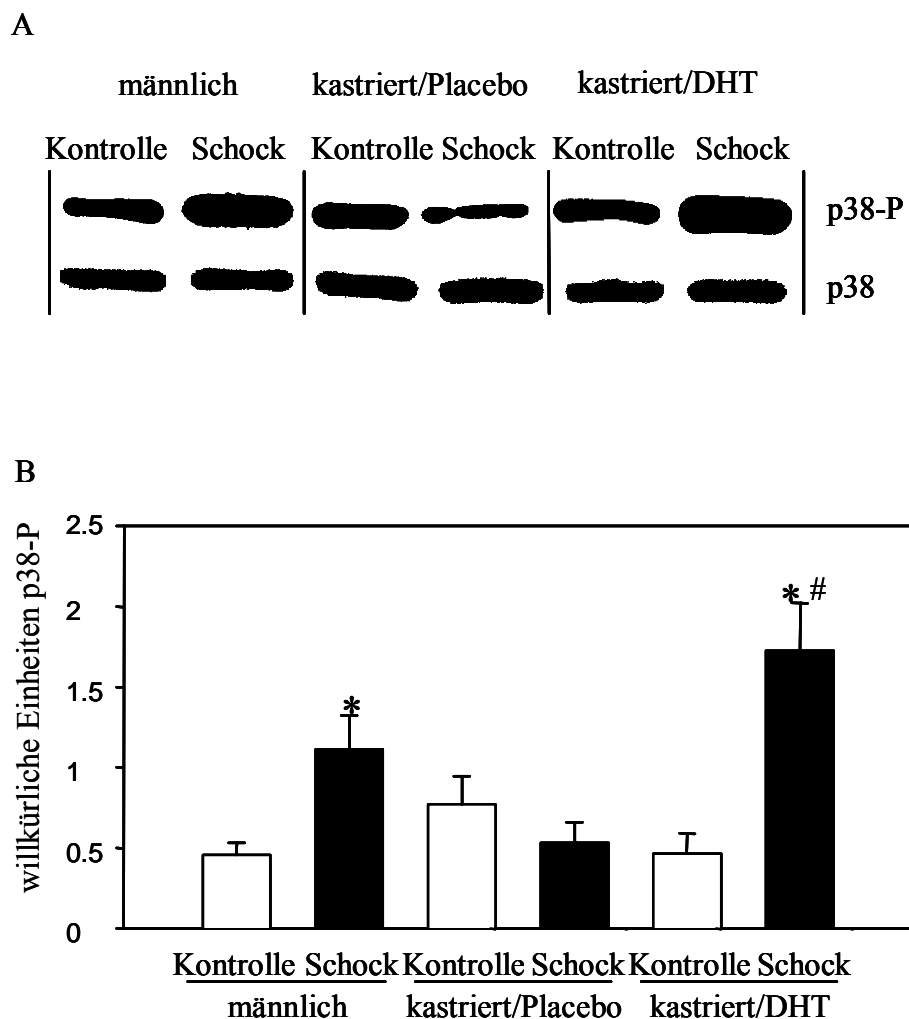


Abb. 26 Die Expression von p38 und phosphoryliertem (P) p38 Protein aus Milzmakrophagen bei männlichen (männlich), kastrierten und mit Placebo (kastriert/placebo) sowie kastrierten und mit DHT (kastriert/DHT) behandelten Mäusen nach Kontrolloperation (Kontrolle) und nach traumatisch-hämorrhagischem Schock (Schock) nachgewiesen mit Western Blot Analyse. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot (A) und die willkürlichen Einheiten.  $n=6$  Tiere/Gruppe. \* $p<0,05$  vs. Kontrolle; # $p<0,05$  vs. Placebo (B).

## 5 Diskussion

### 5.1 Relevanz des Tiermodells und der bestimmten Parameter

Der traumatisch-hämorrhagische Schock und seine Folgen sind die häufigste Todesursache junger Menschen in der westlichen Welt (7, 30, 35). Zahlreiche Tiermodelle wurden entwickelt, um die hierbei auftretenden pathophysiologischen Vorgänge im einzelnen genauer zu untersuchen sowie um neue effektivere Therapiestrategien zu erforschen. Die Experimente, die den Effekt von Schock und schweren Trauma auf das Immunsystem untersuchten, verwendeten häufig Kleintiermodelle, wobei die Untersuchungen größtenteils an der Maus durchgeführt wurden (89). Bei dem im Rahmen dieser Studien angewandten Modell handelt es sich um das seit vielen Jahren im Labor von Dr. Chaudry bewährte traumatisch-hämorrhagische Schockmodell, das ein Blutdruck-kontrolliertes Verfahren darstellt (27). Dies ist ein nicht-letales Modell, welches deutliche immunologische Auswirkungen auf die Versuchstiere besitzt, ohne klinische Parameter, wie Nahrungsaufnahme, Putzverhalten etc. entscheidend zu beeinflussen. Blutdruck-kontrollierte Schockmodelle erlauben im Gegensatz zu Volumen-kontrollierten eine Aussage über den Blutdruckverlauf, was die Standardisierung und Reproduzierbarkeit dieser Modelle erhöht (2).

Der in diesen Studien experimentell herbeigeführte traumatisch-hämorrhagischen Schock führte bei männlichen Mäusen zu einer Unterdrückung der zellulären Immunantwort über einen Zeitraum von 7 Tagen (108). So zeigte sich in diesem Zeitraum z.B. eine Hemmung der Splenozytenfunktion sowie eine Störung der LPS induzierten Zytokinsekretion durch Kupffer-Zellen, Milz- und Peritonealmakrophagen (108). Das Weichteiltrauma in Form der Mittellinien-Laparotomie sowie die Reduktion des Blutdrucks haben einen additiven Effekt auf die Kompromittierung der Zytokinsekretion von Milz- und Peritonealmakrophagen (104). Darüber hinaus konnte eine verminderte Antigenpräsentation und eine verringerte zytotoxische Aktivität von Makrophagen unterschiedlicher Kompartimente nachgewiesen werden (17, 28). Die nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zu beobachtende Unterdrückung der Immunantwort ist tierexperimentell mit einer erhöhten Sterblichkeit bei anschließend induzierter polymikrobieller Sepsis verbunden (27). Vergleichbar lies sich aber auch in klinischen Studien eine signifikante Unterdrückung der zellvermittelten Immunantwort nach Trauma und Blutverlust zeigen, die mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber

septischen Komplikationen einhergeht (18, 36, 38). Zur Bestimmung der Makrophagenfunktion in der Wunde wurde die Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nach 24 Stunden Stimulation mit LPS *in vitro* ermittelt. In einer Reihe von Studien wurde eindrücklich nachgewiesen, dass eine Normalisierung der Zytokinsekretion nach hämorrhagischem Schock mit Hilfe immunmodulatorischer Substanzen zu einer signifikant höheren Überlebensrate bei nachfolgend induzierter Sepsis führte (41, 90). So konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass durch die Behandlung männlicher Mäuse mit Flutamid, Dehydroepiandrosteron (DHEA) oder 17 $\beta$ -Estradiol eine Verbesserung der zellvermittelten Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock erzielt werden konnte. Dies äußerte sich wiederum in Form einer verringerten Mortalität nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im Anschluss an einen schweren Blutverlust (6, 12). Die Bestimmung der proinflammatorischen *in vitro* Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS ist somit ein gewichtiger und zuverlässiger Parameter zur Ermittlung der Makrophagenfunktion unter solchen Bedingungen. Ferner verdeutlicht eine ausgeprägte Verringerung der Mortalität nach traumatisch-hämorrhagischem Schock und Sepsis durch Flutamid, DHEA und 17 $\beta$ -Estradiol die mögliche Bedeutung dieser Therapiekonzepte für die klinische Anwendung.

## 5.2 Einfluss von Testosteron auf die Wunde

### 5.2.1 Beeinflussung der lokalen Zytokinsekretion durch Testosteron

In einer Reihe experimenteller und klinischer Studien konnte eine beeinträchtigte Wundheilung nach Trauma, wie z.B. Frakturen oder Verbrennungen nachgewiesen werden (32, 39, 54, 75). In diesem Zusammenhang stellt die schlecht verheilende Wunde eine potentielle Ursache postoperativ auftretender Komplikationen dar. Insbesondere kann eine beträchtliche Morbidität und Mortalität durch nachfolgende inflammatorische Reaktionen im Gewebe oder Wundinfektionen beobachtet werden. Bei schwer kranken Patienten führen unterdrückte Immunantwort und eingeschränkte Wundheilung zu einer erhöhten Inzidenz von Komplikationen (50, 59). Es konnte hinreichend gezeigt werden, dass die Wundheilung eine Abfolge von speziell aufeinander abgestimmten Abläufen darstellt. Hierbei müssen eine Reihe verschiedener Zelltypen erfolgreich zusammenarbeiten, um eine Wiederherstellung der verlorenen

Gewebeintegrität zu gewährleisten (73). Solche, die exakte Interaktion verschiedener Zelltypen voraussetzenden Abläufe beinhalten z.B. die Ausschüttung bestimmter Zytokine (58). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass es nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zu einer Beeinträchtigung der Wundimmunzellfunktion kommt (9). Diese Beeinträchtigung äußert sich in einer unterdrückten Zytokinsekretionsfähigkeit, die bis zu 3 Tage nach Trauma und hämorrhagischem Schock zu beobachten war. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass unter solchen Umständen die Synthese des für die Wundheilung und Fibroblastenaktivität notwendigen TGF- $\beta$  in der Wunde erniedrigt war (9). Diese Unterdrückung der Wundimmunzellfunktion konnte darüber hinaus mit einer erhöhten Infektionsrate assoziiert werden.

In einer Vielzahl von Studien zeigte sich, dass 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) für die unterdrückte systemische zellvermittelte Immunantwort in männlichen Mäusen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verantwortlich ist (3-5). Obwohl daher die Vermutung nahe liegend ist, dass durch die Unterdrückung von DHT-Plasmaspiegeln sowohl die lokale Wundimmunzellfunktion, als auch die Wundheilung verbessert werden kann, wurde diese Fragestellung bisher noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden männliche Mäuse 2 Wochen vor Durchführung des traumatisch-hämorrhagischen Schocks oder Kontrolloperation kastriert bzw. schein-kastriert. Die Kastration resultierte in signifikant unterdrückten DHT-Plasmaspiegeln (10, 103). Des Weiteren blieb in allen Versuchsgruppen die präoperative Konzentration der Plasmaspiegel von männlichen Sexualhormonen auch durch den traumatisch-hämorrhagischen Schock an sich unverändert. Das Androgen DHT wurde als Parameter für Sexualhormonspiegel in diesen Studien bestimmt, da es die aktivste Form der männlichen Sexualhormone darstellt (97).

In den durchgeführten Studien fand sich nach Trauma und hämorrhagischem Schock eine unterdrückte Fähigkeit von Wundimmunzellen normaler männlicher Mäuse, proinflammatorische Zytokine zu sezernieren, wenn sie anschließend *in vitro* mit LPS stimuliert wurden. Dies ist vergleichbar zu bisherigen Ergebnissen, bei denen sich in anderen Kompartimenten, wie z.B. Splenozyten, Milz- oder Peritonealmakrophagen, bis zu 3 Tage nach Trauma und hämorrhagischem Schock eine veränderte Zytokinsekretion fand (9). Im Bereich der Wunde konnte ein direkter Zusammenhang zwischen einer unterdrückten Wundimmunzellfunktion und einer erhöhten Rate an Wundinfektionen nachgewiesen werden (9).

Die Verringerung der Androgenplasmaspiegel durch Kastration 2 Wochen vor Trauma und hämorrhagischem Schock stellte die zuvor beobachtete unterdrückte Fähigkeit der Wundimmunzellen zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 vollständig wieder her. Da weder der prozentuale Anteil der Makrophagen und Granulozyten innerhalb der Wundimmunzellen, noch die Gesamtzahl der Wundimmunzellen durch Kastration oder traumatisch-hämorrhagischen Schock beeinflusst wurden, scheint es sich bei der in kastrierten Mäusen beobachteten verbesserten Sekretionsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine tatsächlich um qualitative und nicht um quantitative Effekte zu handeln.

Unter den gleichen Bedingungen kann durch die Unterdrückung normaler DHT-Plasmaspiegel auch systemisch die Sekretionsfähigkeit immunkompetenter Zellen normalisiert werden. Dies resultiert in einer geringeren Anfälligkeit männlicher Mäuse gegenüber dem Auftreten einer Sepsis bzw. einem signifikant verbessertem Überleben männlicher Mäuse nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis. Eine solche Unterdrückung normaler DHT-Plasmaspiegel kann z.B. durch den Einsatz des Testosteron-Rezeptor-Blockers Flutamide erreicht werden, der sich für andere Indikationen bereits im breiten klinischen Einsatz befindet. Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Zusammenhänge kann daher vermutet werden, dass durch den Einsatz solcher Wirkstoffe die Wundinfektionsrate unter den Bedingungen eines ausgedehnten Weichteiltraumas mit großem Blutverlust verringert werden könnte.

Interessanter Weise hatte die Kastration der Mäuse keinerlei Auswirkungen auf die Sekretionsfähigkeit der Wundimmunzellen nach Kontrolloperation. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in Peritoneal- und Milzmakrophagen nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich eine Wiederherstellung der unterdrückten Zytokinsekretionsfähigkeit nach Trauma und hämorrhagischem Schock durch vorherige Kastration der Tiere, wohingegen kein Einfluss der Kastration auf die zellvermittelte Immunität nach Kontrolloperation gefunden wurde (10, 103). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass physiologische Plasmaspiegel von DHT nur im immunologisch kompromittiertem Organismus (z.B. schwerer Blutverlust, Trauma oder Verbrennung) schädliche Auswirkungen haben, nicht aber unter normalen Bedingungen.

Eine mögliche Erklärung findet sich in neuen Studien von Schneider *et al.* und Samy *et al.*, die in diesem Zusammenhang erst kürzlich zeigen konnten, dass der intrazelluläre Steroidmetabolismus von DHT nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verändert ist (96, 97, 110). In diesen Studien fand sich in Lymphozyten und

Milzmakrophagen männlicher Mäuse nach Trauma und hämorrhagischem Schock eine erhöhte intrazelluläre Syntheserate von DHT bei gleichzeitig verringertem Abbau dieses Steroidhormons (96, 110). Im Einzelnen scheint die Aktivität der an dem DHT-Metabolismus beteiligten Enzyme verändert zu sein. So konnte nach Trauma und hämorrhagischem Schock eine erhöhte Aktivität der DHT bildenden  $5\alpha$ -Reduktase nachgewiesen werden, wohingegen die Aktivität der das DHT abbauenden  $17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase vermindert war (96, 110). Auch wenn die Aktivität der für den DHT-Metabolismus verantwortlichen Enzyme nach Trauma und hämorrhagischem Schock in den vorliegenden Studien nicht in der Wundimmunzelle untersucht wurde, so legen diese Ergebnisse doch den Schluss nahe, dass ein erhöhter intrazellulär DHT-Spiegel bei unveränderten Plasmaspiegeln für die fehlende Immunantwort von Wundimmunzellen unter solchen Bedingungen verantwortlich ist. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass Androgene unter normalen Bedingungen die Zytokinsekretion von Makrophagen nicht beeinflussen (15, 34, 79, 87). So wiesen Ansar-Ahmed *et al.* z.B. in einer Studie nach, dass die Gabe von Testosteron in physiologischen Konzentrationen über einen Zeitraum von 2-4 Wochen die Sekretion von IL-2 aus Splenozyten von C57BL/6 Mäusen nicht beeinflusste (13).

Zusammenfassend legen diese Daten den Schluss nahe, dass die Wundinfektionsrate durch die erhaltene Wundimmunzellfunktion in entsprechend mit Testosteron-Rezeptor-Blockern behandelten Organismen reduziert werden kann. Obwohl in den vorliegenden Studien die Anfälligkeit für Wundinfektionen nicht bestimmt wurde, konnte doch in früheren Experimenten nachgewiesen werden, dass eine Unterdrückung der Zytokinsekretionsfähigkeit durch Wundimmunzellen mit einer erhöhten Wundinfektionsrate verbunden ist. Die unter solchen Bedingungen unterdrückte Wundimmunzellfunktion in männlichen Mäusen normalisiert sich im weiteren Verlauf nach 5-7 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich eine erhöhte Wundinfektionsrate auch in männlichen Mäusen nach Trauma und Blutverlust nicht mehr nachweisen (8, 9, 70, 96, 110). Im einzelnen konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Fähigkeit der Wundimmunzellen zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen mit einer erhöhten Rate an Wundinfektionen einhergeht (8, 9, 70, 96, 110).

### 5.2.2 Divergente *in vitro* und *in vivo* Reaktionen in der Wunde

Im Gegensatz zu der in männlichen Mäusen nach Trauma und hämorrhagischem Schock und *in vitro* Stimulation mit LPS unterdrückten Sekretionsfähigkeit proinflammatorischer Zytokine durch Wundimmunzellen war die mittels Immunhistochemie bestimmte IL-6 Expression in der Wunde unter solchen Bedingungen signifikant erhöht. In ähnlicher Weise fand sich in Milzmakrophagen nach Trauma und hämorrhagischem Schock eine erhöhte IL-6 Expression, während die *in vitro* Antwort dieser Zellen nach Stimulation mit LPS in Form der proinflammatorischen Zytokinsekretion unter gleichen Bedingungen unterdrückt ist (112). Umgekehrt führt die Verminderung der Androgenplasmaspiegel durch vorherige Kastration zu einem Ausbleiben der erhöhten inflammatorischen Reaktion am Ort der Wunde und einem Wiederauftreten der *in vitro* bestimmten Fähigkeit der Wundimmunzellen, auf eine LPS-Stimulation durch adäquate proinflammatorische Zytokinsekretion zu reagieren. Des Weiteren zeigten sich in der Wundflüssigkeit normaler Mäuse nach Trauma und hämorrhagischem Schock signifikant erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine. Durch vorherige Kastration glichen sie sich den Werte der Mäuse nach Kontrolloperation an (unveröffentlichte Beobachtung).

In diesen beiden Fällen liegt ein scheinbarer Widerspruch zwischen der *in vitro* und der *in vivo* Reaktion in der Wunde vor. Dies legt die Vermutung nahe, dass es durch die übertriebene und exzessive Reaktion der Wundimmunzellen normaler männlicher Mäuse, wie sie nach Trauma und hämorrhagischem Schock auftritt, zu einem gewissen Erschöpfungszustand dieser Zellen kommt. Dieser erlaubt Ihnen nicht mehr, adäquat auf einen zweiten Stimulus – z.B. in Form von LPS – zu reagieren. Gestützt wird diese Vermutung durch frühere Ergebnisse, die erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine in der Wundflüssigkeit nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zeigten (8). Darüber hinaus scheint das proinflammatorische Zytokin IL-6 einer der Hauptfaktoren für die nachgewiesene inhibitorische Wirkung von Wundflüssigkeit auf die Proliferationsrate von Fibroblasten zu sein (74). Somit könnte eine Verringerung der Androgenplasmaspiegel vor traumatisch-hämorrhagischem Schock dazu beitragen, die in männlichen Mäusen unter diesen Umständen unterdrückte Immunantwort von Wundimmunzellen durch Vermeidung einer exzessiven inflammatorischen Reaktion am Ort der Wunde wiederherzustellen. Die Erforschung dieser Hypothese bedarf jedoch weiterer Studien.

### 5.2.3 Auswirkungen von Androgenen auf die Reißfestigkeit der Wundhaut

Zur Untersuchung, ob diese zellulären Effekte einer präoperativen Kastration mit einer Verbesserung der Wundheilung einhergehen, wurde die Reißfestigkeit der Wundhaut bei kastrierten und schein-kastrierten Tieren nach traumatisch-hämorrhagischem Schock untersucht. Hierzu wurde die Haut aus dem Bereich der Wunde am 10. postoperativen Tag gewonnen. Es zeigte sich eine verminderte Reißfestigkeit der Wundhaut männlicher Mäuse nach Trauma und hämorrhagischem Schock verglichen mit der Wundhaut, die von Tieren nach Kontrolloperation gewonnen wurde. Wiederum führte eine 2 Wochen vor der Operation durchgeführte Kastration zu einer Normalisierung der Reißfestigkeit der Wundhaut am 10. postoperativen Tag. Somit kann vermutet werden, dass eine Verminderung der exzessiven inflammatorischen Reaktion und eine Wiederherstellung der unterdrückten Wundimmunzellfunktion mit einer normalen Reißfestigkeit der Wundhaut einhergeht. Der kausale Zusammenhang muss jedoch in weiterführenden Studien validiert werden.

Die Hypothese findet jedoch Unterstützung in Studien von Salomon *et al.*. Hier konnte nachgewiesen werden, dass bei Ratten durch die topische Applikation des proinflammatorischen Zytokins  $\text{TNF-}\alpha$  die mechanische Festigkeit von Inzisionswunden vermindert wurde (93). In ähnlicher Weise waren verringerte Spiegel proinflammatorischer Zytokine in der Wundflüssigkeit endotoxin-resistenter Mäuse mit einer erhöhten Reißfestigkeit der Wunde innerhalb der ersten 7 Tage nach Verletzung verbunden (47). Diese Studien legen den Schluss nahe, dass auch im Falle der in männlichen Mäusen nach Trauma und hämorrhagischem Schock aufgetretenen verschlechterten Wundheilung eine vermehrte inflammatorische Reaktion in der Wunde sowie eine verminderte Wundimmunzellfunktion als ursächlich anzusehen ist. Da sowohl die prozentuale Zellverteilung als auch die absoluten Zellzahlen von Wundimmunzellen in Tieren nach Trauma und hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation unverändert sind, scheint die verschlechterte Wundheilung nach Blutverlust und Schock nicht durch eine geringere Anzahl an Fibroblasten verursacht zu sein.

Im Rahmen der vorliegenden Studien wurde die Reißfestigkeit der Wundhaut jedoch nur an einem einzigen Zeitpunkt, 10 Tage postoperativ, bestimmt. Somit ist es anhand dieser Daten nicht möglich zu unterscheiden, ob die verschlechterte Wundheilung nach Trauma und hämorrhagischem Schock und ihre Normalisierung nach vorheriger Kastration der Tiere auf einer Veränderung des endgültigen Ergebnisses der Wundheilung oder einem veränderten Wundheilungsprozess beruht. In weiteren



Studien zur Klärung dieser Fragestellung muss erst noch die Reißfestigkeit der Wunde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. In Studien von Levenson *et al.* zeigte sich 7 Tage nach einem Verbrennungstrauma eine histologisch veränderte Wundheilung, die jedoch nach 14 Tagen auch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht mehr nachweisbar war (69). Vergleichbar fand sich in Tieren, bei denen nach einem Weichteiltrauma eine polymikrobielle Sepsis induziert wurde, eine über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Reißfestigkeit. Nach 3-5 Wochen war ein Unterschied zwischen der Sepsis- und Nicht-Sepsis-Gruppe jedoch nicht mehr nachweisbar (52). Es ist daher anzunehmen, dass der Wundheilungsprozess zu einem späteren Zeitpunkt auch in normalen männlichen Mäusen nach Trauma und hämorrhagischem Schock das gleiche Niveau erreicht, vergleichbar dem Niveau in 2 Wochen zuvor kastrierten Tieren. Dennoch könnte die Prävention einer initial verlangsamt ablaufenden Wundheilung nach Trauma und hämorrhagischem Schock die Inzidenz potentieller Komplikationen in chirurgischen Patienten verringern.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass Wundimmunzellfunktion und Reißfestigkeit der Wundhaut nach Trauma und hämorrhagischem Schock in normalen männlichen Mäusen signifikant unterdrückt waren. Die Kastration männlicher Mäuse 2 Wochen vor Durchführung des hämorrhagischen Schocks verhinderte jedoch das Versagen der Wundimmunzellen und verbesserte die Reißfestigkeit der Wundhaut unter solchen Umständen. Zusätzlich wurde die sonst nach Schock zu beobachtende exzessive inflammatorische Reaktion in Form einer vermehrten Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der Wundhaut und die in der Wundflüssigkeit gemessenen erhöhten Spiegel dieses Zytokins verhindert. Deshalb führt die Verringerung der Androgenplasmaspiegel nach einem traumatisch-hämorrhagischen Schockereignis im Gefolge einer verminderten IL-6 Ausschüttung im Bereich der Wunde zu einer wiederhergestellten Wundimmunzellfunktion sowie zu einer verbesserten Wundheilung. Obwohl die potentiell immunprotektiven Auswirkungen eines Testosteronrezeptorblockers auf die Wunde nicht untersucht wurden, lässt sich anhand früherer Ergebnisse ableiten, dass die kurzzeitige Verabreichung von Flutamid während oder nach Trauma und Schock einen ähnlich positiven Einfluss auf die lokale Wundimmunzellfunktion hätte, wie in anderen Kompartimenten (12, 102). Somit könnte der Versuch, die Wundimmunzellfunktion, und die Wundheilung durch den Einsatz von Testosteronrezeptorblockern zu

verbessern, eine neue und Erfolg versprechende Ergänzung zur Prävention von chirurgischen Wundinfektionen darstellen.

### 5.3 Einfluss von Testosteron auf die Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen

Welche Mechanismen der Immunmodulation durch männliche Sexualhormone nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zugrunde liegenden, ist nach wie vor unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Trauma und Blutverlust eine Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen der MAP-Kinase-Familie auftritt, die für die Steuerung der inflammatorischen Reaktion unter diesen Bedingungen verantwortlich sind (90). Insbesondere wurde die Aktivierung von p38 MAP-Kinase in einer Vielzahl von Studien nach Trauma, Blutverlust und Ischämie untersucht (81, 88, 90). Die Aktivierung von p38 MAP-Kinase scheint entscheidend an der Kontrolle der inflammatorischen Reaktion nach hämorrhagischem Schock beteiligt zu sein (81, 88, 90). Es ist weiterhin bekannt, dass die Aktivierung von p38, ebenso wie die Aktivierung einer Reihe anderer Signaltransduktionsmechanismen durch männliche Sexualhormone bei Normaltieren moduliert werden kann (20, 21).

Weitere Studien konnten zeigen, dass die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von p38 nach traumatisch-hämorrhagischem Schock in männlichen und weiblichen Mäusen signifikant unterschiedlich ist. Während es unter solchen Umständen in weiblichen Mäusen zu einer verminderten Phosphorylierung von p38 kam, zeigte sich in männlichen Mäusen eine signifikant erhöhte Aktivierung von p38.

Diese Studien legen nahe, dass die beobachtete geschlechtsspezifische Immunantwort auf molekularer Ebene durch eine unterschiedliche Aktivierung dieser Signaltransduktionsmechanismen bedingt ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Aktivierung von p38 in Form von Phosphorylierung von p38 in Milz- und Peritonealmakrophagen zwei Std. nach Trauma und hämorrhagischem Schock sowie nachfolgender Stimulation mit LPS für 20 min. bestimmt. Hierfür wurden Milz- und Peritonealmakrophagen verwendet, da es sich bei der p38 Signaltransduktion um einen frühen Mechanismus in der Kaskade der Immunaktivierung handelt. Die Immunzellen sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend in die Wunde und somit in die Schwämmchen migriert, um entsprechende Untersuchungen durchführen zu können. Da die Zytokinsekretionsmuster von Wundimmunzellen sowie Milz- und

Peritonealmakrophagen vergleichbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass sich bei den Aktivierungsmustern von p38 ebenfalls ein vergleichbares Bild abzeichnet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien zeigen, dass die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in den Milz- und Peritonealmakrophagen männlicher Versuchstiere nach traumatisch-hämorrhagischem Schock im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant zunimmt. Wurden die Tiere jedoch 2 Wochen vor einem solchen Ereignis kastriert, zeigte sich eine verminderte Aktivierung von p38, ähnlich der Reaktion, wie sie in weiblichen Versuchstieren beobachtet wird. Nach Substitution der kastrierten Mäuse mit DHT über einen Zeitraum von 2 Wochen trat wiederum eine signifikant erhöhte Phosphorylierung auf, wie zuvor in den normalen männlichen Mäusen beobachtet.

Diese Ergebnisse scheinen zunächst einen Widerspruch zu den zuvor beschriebenen Daten der Zytokinsekretion darzustellen. Aufgrund der in den Wundimmunzellen verminderten Zytokinsekretionsfähigkeit in normalen Mäusen nach Trauma und hämorrhagischem Schock wäre ebenfalls eine verminderte Aktivierung der Signaltransduktion zu erwarten gewesen. Im Gegensatz zu der unterdrückten Zytokinsekretion nach Stimulation mit LPS *in vitro* fand sich aber in Milz- und Peritonealmakrophagen nach Trauma und Blutverlust sowie anschließender zwei-stündiger Stimulation mit LPS eine vermehrte RNA-Expression proinflammatorischer Zytokine (111, 112). Es erscheint daher wahrscheinlicher, dass es nach Trauma und hämorrhagischem Schock durch die vermehrte Aktivierung von p38 in den Milz- und Peritonealmakrophagen zunächst zu einer erhöhten proinflammatorischen Zytokin-Antwort kommt. Diese scheint mit einer Erschöpfung der betroffenen Zellen verbunden zu sein, so dass diese nicht mehr adäquat auf eine *in vitro* Stimulation reagieren können. Weiterhin könnte die in weiblichen Tieren beobachtete unterdrückte Aktivierung von p38 eine verminderte Ribonukleinsäure (RNA) -Expression proinflammatorischer Zytokine bewirken, und hierdurch die Fähigkeit zur *in vitro* Sekretion der Zytokine in diesen Mäusen erhalten bleiben. Diese Hypothese wird unterstützt durch die in der vorgestellten Arbeit immunhistochemisch nachgewiesene erhöhte Sekretion von IL-6 *in vivo* in normalen männlichen Mäusen unter solchen Bedingungen.

Guo *et al.* konnten wiederum keinen Einfluss von Testosteron auf die Aktivierung von p38 in aus Ratten gewonnenen, intrazellulär Androgenrezeptor-freien, RAW 264.7 Makrophagen nachweisen. Wurden jedoch intrazellulär Androgenrezeptor-freie RAW Makrophagen aus der Ratte *in vitro* mit LPS stimuliert, so konnte durch Zugabe von

Testosteron ins Kulturmedium die Phosphorylierung von p38 erhöht werden (55). In diesem experimentellen Versuchsaufbau wurde die Aktivierung von ERK I und II durch Testosteron nicht beeinflusst (55). In den vorliegenden Studien wurde lediglich die Aktivierung des p38 MAP-Kinase Signaltransduktionsmechanismus untersucht. Weitere Studien sind erforderlich, um die Auswirkungen von unterschiedlichen Sexual- und Steroidhormon-Spiegeln, z.B. Östradiol, DHEA auf andere Signaltransduktionsmechanismen, wie z.B. ERK I und II nach traumatisch-hämorrhagischem Schock zu untersuchen, um das komplexe Netzwerk aktivierter Signale nach Schock besser zu verstehen. In weiteren Studien kann unter der Verwendung des spezifischen p38-Blockers SB203580 die Bedeutung von p38 für die geschlechtsspezifische Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock ermittelt werden. Dies ist insbesondere wichtig, da durch schweres Trauma und Schock verschiedene parallele Signaltransduktionsmechanismen aktiviert werden, die zu ähnlichen Reaktionen auf zellulärer Ebene sowie zu einer Induktion der inflammatorischen Immunantwort führen (68). So konnte in dieser Hinsicht kürzlich eine Interaktion zwischen p38 und extrazellulär regulierter Kinase (ERK) gezeigt werden, nachdem die Blockierung von p38 in einer Hochregulation von ERK resultierte (56).

Die zugrunde liegenden Mechanismen, über die DHT nach traumatisch-hämorrhagischen Schock seinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 in Milz- und Peritonealmakrophagen ausübt, bleiben weiterhin unbekannt. Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Verabreichung des Androgenrezeptorblockers Flutamid zu einer Wiederherstellung der unterdrückten Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock führte, legen jedoch die Vermutung nahe, dass die das Immunsystem beeinflussenden Effekte von DHT über Androgenrezeptoren vermittelt werden. In diesem Kontext wurden Androgenrezeptoren auf einer Reihe von Zellen nachgewiesen, so z.B. auf makrophagen-artigen Synovialzellen, imaturen monocystischen Zellen sowie auf T- und B-Zellen (95, 107). Ob DHT die erhöhte p38-Aktivierung jedoch über eine direkte Bindung an Androgenrezeptoren von Milz- und Peritonealmakrophagen erzeugt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hierbei könnten weitere *in vitro* Versuche mit dem Androgenrezeptorblocker Flutamid nützlich sein. Auch hier stellt sich die Frage nach einer geschlechtsabhängig unterschiedlichen Aktivierung der für den Metabolismus der Sexualhormone verantwortlichen Enzyme. In neueren Studien konnte eine zentrale Rolle der Enzyme der Sexualhormonsynthese nachgewiesen werden (94, 97). Die Rolle der einzelnen Enzyme in Bezug auf die

veränderte p38-Aktivierung nach Trauma und Blutverlust zu untersuchen geht jedoch über die Ziele der vorliegenden Studien hinaus.

Die Ergebnisse dieser Studien legen den Schluss nahe, dass unterschiedliche Plasmaspiegel des männlichen Sexualhormons DHT bei der Erforschung von Signaltransduktionsmechanismen nach Trauma und Blutverlust oder anderen Krankheitsmodellen berücksichtigt werden sollten.

## 5.4 Klinische Relevanz

Eine Reihe klinischer Studien zeigt eine verschlechterte Wundheilung bei chirurgischen Patienten nach schwerem Blutverlust. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Verringerung von Androgenplasmaspiegeln durch Kastration oder die Verabreichung des Testosteronrezeptorblockers Flutamid die unterdrückte zellvermittelte Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock wiederherstellt und die Anfälligkeit gegenüber einer nachfolgenden Sepsis verringert. Die vorliegenden Untersuchungen weiten diese Ergebnisse aus und zeigen, dass durch die Verringerung von Androgenplasmaspiegeln eine normale Wundimmunzellfunktion und eine verbesserte Wundheilung bewirkt werden kann. Nachdem diese Substanzen bei Patienten auf Grund anderer Indikationen bereits klinisch eingesetzt werden, könnten diese Studien dazu beitragen, neuartige klinisch relevante Therapiekonzepte unter Verwendung von Androgenrezeptorantagonisten zur Reduzierung der Rate von Wundkomplikationen, septischen Komplikationen und dadurch der Mortalität nach Trauma, Blutverlust und operativen Eingriffen zu entwickeln.

Darüber hinaus stellen die untersuchten p38 MAP-Kinase Signaltransduktionsmechanismen einen potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte dar, um Immunfunktionen nach schwerem Trauma und Blutverlust aufrecht zu erhalten.

## 6 Zusammenfassung

Klinische und epidemiologische Studien zeigten eine erhöhte Inzidenz von septischen Komplikationen in männlichen Patienten infolge von schweren Traumen und großem Blutverlust. Vergleichbar fand sich in Mäusen eine geschlechtsspezifische Immunantwort nach traumatisch-hämorrhagischem Schock. Bei männlichen Mäusen war eine signifikante Unterdrückung der zellvermittelten Immunantwort nachweisbar. Insgesamt wiesen männliche Sexualhormone eher immunsuppressive Eigenschaften auf, während weibliche Sexualhormone immunprotektiv wirkten. Kastration männlicher Mäuse vor traumatisch-hämorrhagischem Schock resultierte in einer Normalisierung der *in vitro* Zytokinsekretion von Milz- und Peritonealmakrophagen. Neben einer Unterdrückung dieser systemischen Immunantwort fand sich bei männlichen Mäusen eine Kompromittierung der Wundimmunzellfunktion und der Wundheilung. Ob die geschlechtsspezifische lokale Immunantwort und eingeschränkte Wundheilung nach traumatisch-hämorrhagischem Schock durch den Einfluss von Testosteron vermittelt werden, war bislang unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei männlichen Mäusen durch Kastration zwei Wochen vor Durchführung des traumatisch-hämorrhagischen Schocks eine Verbesserung der Zytokinsekretionsfähigkeit von Wundimmunzellen gezeigt werden. Gleichzeitig wurde durch Kastration der Mäuse eine unkontrollierte inflammatorische Reaktion in der Wunde verhindert. Diese lokalen immunologischen Veränderungen unter solchen Bedingungen waren verbunden mit einer normalisierten Reifefestigkeit der Wundhaut in kastrierten Mäusen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Studien, dass Testosteron für die lokale Immunsuppression von männlichen Versuchstieren am Ort der Wunde verantwortlich ist. Dies steht in Einklang zu den bereits zuvor in anderen Kompartimenten gezeigten Auswirkungen männlicher Sexualhormone.

In weiteren Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die inflammatorische Reaktion nach schwerem Trauma, Blutverlust und Schock auf molekularer Ebene unter anderem durch die intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen der p38 MAP-Kinase-Familie vermittelt wird. Hierbei konnte eine direkte, geschlechtsspezifische Aktivierung der p38 MAP-Kinase nach traumatisch-hämorrhagischem Schock nachgewiesen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der direkte Einfluss des männlichen Sexualhormons Testosteron auf zellulärer

Ebene ermittelt. Nachdem es sich hierbei um einen frühen Mechanismus in der Kaskade der Immunaktivierung handelt, wurden diese Untersuchungen nicht an Wundimmunzellen durchgeführt, die erst im weiteren Verlauf in die Wundschwämme migrieren. Anhand von Milz- und Peritonealmakrophagen konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Aktivierung von p38 nach Trauma und hämorrhagischem Schock gezeigt werden, die durch Kastration auf Werte vergleichbar der Aktivierung in weiblichen Mäusen reduziert wurde. Da in Milz- und Peritonealmakrophagen ähnliche Zytokinsekretionsmuster wie in der Wunde nachgewiesen wurden, scheint die Annahme gerechtfertigt, die Ergebnisse auf die in der Wunde ablaufenden Mechanismen zu übertragen. Der scheinbare Widerspruch einer erhöhten p38-Aktivierung in männlichen Mäusen bei erniedrigter Zytokinsekretionsfähigkeit der Immunzellen scheint auf einer Erschöpfungsreaktion dieser Zellen zu beruhen. Eine adäquate, immunkompetente Reaktion dieser Zellen auf entsprechende Reize könnte nach traumatisch-hämorrhagischem Schock nicht mehr gegeben sein.

Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass das androgene Steroidhormon Testosteron für die nachgewiesenen immunsuppressiven Reaktionen nach Trauma und schwerem Blutverlust verantwortlich ist. In weiterführenden klinisch-experimentellen Studien muss das theoretisch vorhandene therapeutische Potenzial einer peri- oder postoperativen Prophylaxe und Therapie mittels medikamentöser Testosteron-Rezeptorblockade überprüft werden. Hiervon könnten insbesondere die im Rahmen von schweren Traumata und großen operativen Eingriffen gefährdeten männlichen Patienten profitieren. Die vorliegende Arbeit lässt den kurzfristigen peri- oder postoperativen Einsatz dieser Substanzen beim elektiv-chirurgischen oder Traumapatienten zur Verhinderung von Wundinfektionen und anderen Komplikationen der Wunde sinnvoll erscheinen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia - United States. 1979-1987. *MMWR* 39: 31-34, 1990.
2. Abraham E, Richmond JN, and Chang YH. Effects of hemorrhage on interleukin-1 production. *CircShock* 25: 33-40, 1988.
3. Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Testosterone: The culprit for producing splenocyte depression following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 274: C1530-C1536, 1998.
4. Angele MK, Ayala A, Monfils BA, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Testosterone and/or low estradiol: Normally required but harmful immunologically for males after trauma-hemorrhage. *J Trauma* 44: 78-85, 1998.
5. Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, and Chaudry IH. Effect of gender and sex on immune responses following shock. *Shock* 14: 81-90, 2000.
6. Angele MK, Catania RA, Ayala A, Cioffi WG, Bland K, and Chaudry IH. Dehydroepiandrosterone (DHEA): An inexpensive steroid hormone which decreases the mortality from sepsis. *Arch Surg* 133: 1281-1288, 1998.
7. Angele MK and Faist E. Immunosuppression with injury and operation and increased susceptibility to infection. In: *SIRS, MODS and MOF - Systemic inflammatory response syndrome, multiple organ failure - pathophysiology, prevention and therapy.*, edited by Baue AE, Faist E and Fry D. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000, p. 134-142.
8. Angele MK, Knoferl MW, Ayala A, Albina JE, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Trauma-hemorrhage delays wound healing potentially by increasing proinflammatory cytokines at the wound site. *Surgery* 126: 279-285, 1999.
9. Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Bland KI, Cioffi WG, Josephson SL, and Chaudry IH. Hemorrhage decreases macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and IL-6 release: A possible mechanism for increased wound infection. *Ann Surg* 229: 651-661, 1999.
10. Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Sex steroids regulate pro- and antiinflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 277: C35-C42, 1999.
11. Angele MK, Knoferl MW, Song GY, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Gender dimorphism of the immune response following trauma-hemorrhage: Involvement of p38 MAP kinase signal transduction pathways. *Surg Forum* 50: 278-280, 1999.
12. Angele MK, Wichmann MW, Ayala A, Cioffi WG, and Chaudry IH. Testosterone receptor blockade after hemorrhage in males: Restoration of the depressed



immune functions and improved survival following subsequent sepsis. *Arch Surg* 132: 1207-1214, 1997.

13. Ansar AS, Penhale WJ, and Talal N. Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases: mechanisms of sex hormone action. *AmJPathol* 121: 531-551, 1985.
14. Ayala A, Deol ZK, Lehman DL, Herdon CD, and Chaudry IH. Polymicrobial sepsis but not low dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-gamma release while increasing IL- 4/IL-10 production. *JSurgRes* 56: 579-585, 1994.
15. Ayala A, Herdon CD, and Chaudry IH. Polymicrobial sepsis induces apoptosis in mucosal lymphoid B- cells but not in helper T-cells. *FASEB J* 9: A1033, 1995.
16. Ayala A, Perrin MM, Wagner MA, and Chaudry IH. Enhanced susceptibility to sepsis following simple hemorrhage: Depression of Fc and C3b receptor mediated phagocytosis. *ArchSurg* 125: 70-75, 1990.
17. Ayala A, Perrin MM, Wang P, Ertel W, and Chaudry IH. Hemorrhage induces enhanced Kupffer cell cytotoxicity while decreasing peritoneal or splenic macrophage capacity: involvement of cell-associated TNF and reactive nitrogen. *J Immunol* 147: 4147-4154, 1991.
18. Baue AE. Multiple Organ Failure. In: *Multiple Organ Failure: Patient Care and Prevention*, edited by Baue AE. St. Louis,MO: Mosby Year Book, 1990, p. 421-470.
19. Baue AE. *Multiple Organ Failure. Patient Care and Prevention*. St. Louis: Mosby, 1990.
20. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344, 1989.
21. Beato M, Chavez S, and Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61: 240-251, 1996.
22. Beyaert R, Cuenda A, Vanden BW, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, and Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 15: 1914-1923, 1996.
23. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett J, C.C., Carl VS, and Peterson VM. Interleukin-6 (IL-6) delays neutrophil (PMN) apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor (PAF). *JTrauma* 39: 163-163, 1995.
24. Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 268: 3452-3455, 1992.
25. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von FA, and Schultz GS. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- beta. *Ann Surg*: 788-794, 1988.

26. Buck M, Houglum K, and Chojkier M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha1(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *AmJ Pathol* 149: 195-204, 1996.
27. Chaudry IH and Ayala A. *Immunological Aspects of Hemorrhage*. Austin, TX: Medical Intelligence Unit; R.G. Landes Company, 1992.
28. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, and Stephan RN. Editorial Review. Hemorrhage and resuscitation: Immunological Aspects. *AmJPhysiol* 259: R663-R678, 1990.
29. Chaudry IH, Stephan RN, Harkema JM, and Dean RE. Immunological alterations following simple hemorrhage. In: *Immune Consequences of Trauma, Shock, and Sepsis: Mechanisms and Therapeutic Approaches*, edited by Faist E, Ninnemann J and Green D. Berlin: Springer-Verlag, 1989, p. 363-373.
30. Chaudry IH, Wichmann MW, and Ayala A. "Immunological alterations following hemorrhagic shock: Considerations for resuscitation with blood substitutes." In: *Fundamental Principles and Clinical Applications of Blood Substitutes*, edited by Rabinovici R, Feuerstein G and Randolph AS. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 165-188.
31. Control CfD. Mortality Patterns - United States, 1989. *MMWR* 41: 121-125, 1992.
32. Crowley LV, Seifter E, Kriss P, Rettura G, Nakao K, and Levenson SM. Effects of enviromental temperature and femoral fracture on wound healing in rats. *J Trauma* 17: 436-445, 1977.
33. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, and Franchimont P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *CritCare Med* 17: 975-978, 1989.
34. Dassouli A, Darne C, Fabre S, Manin M, Veyssiere G, and Jean CI. Vas deferens epithelial cells in subculture: a model to study androgen regulation of gene expression. *J Mol Endocrin* 15: 129-141, 1995.
35. DeCamp MM and Demling RH. Post-traumatic multisystem organ failure. *JAMA* 260: 530-534, 1988.
36. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9: 1-11, 1998.
37. Deitch EA. *Multiple organ failure: pathophysiology and basic concepts of therapy*. New York: Thieme Medical Publishers, Inc., 1990.
38. Deitch EA. Multiple Organ Failure: Pathophysiology and potential future therapy. *AnnSurg* 216: 117-134, 1992.
39. Diegelman RF, Lindblad WJ, and Cohen IK. A subcutaneous implant for wound healing studies in humans. *J Surg Res* 40: 229-237, 1986.
40. Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *The FASEB J* 2: 108-115, 1988.

41. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, and Chaudry IH. Chloroquine attenuates hemorrhagic shock-induced immunosuppression and decreases susceptibility to sepsis. *ArchSurg* 127: 70-76, 1992.
42. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Perrin MM, and Chaudry IH. Anti-TNF monoclonal antibodies prevent haemorrhage-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and MHC class II antigen expression. *Immunology* 74: 290-297, 1991.
43. Fahey TJ, III, Sherry B, Tracey KJ, van Deventer S, Jones WG, II, Minei JP, Morgello S, Shires GT, and Cerami A. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine*: 92-99, 1990.
44. Faist E, Meakins J, and Schildberg FWe. *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.
45. Faist E and Wichmann MW. Immunologie bei Schwerverletzten. *Chirurg* 68: 1066-1070, 1997.
46. Feero S, Hedges JR, Simmons E, and Irwin L. Intracity regional demographics of major trauma. *AnnEmergMed* 25: 788-793, 1995.
47. Finbloom DS and Lerner AC. Induction of early response genes by interferons, interleukins, and growth factors by the tyrosine phosphorylation of latent transcription factors: implicatins for chronic inflammatory diseases. *Arth Rheum*: 887-889, 1995.
48. Ford HR, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre L, and Simmons RL. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* 124: 1422-1428, 1989.
49. Fry DE. Diagnosis and epidemiology of multiple organ failure. In: *Multiple organ failure - Pathophysiology and basic concepts of therapy.*, edited by Deitch EA. New-York - Stuttgart: Thieme, 1990, p. 13-25.
50. Goris R, Te Boekhorst T, and Nuytinck J. Multiple-organ failure: Generalized autodestructive inflammation. *Arch Surg* 120: 1109, 1985.
51. Goris RJA. Sepsis and multiple organ failure: The result of whole body inflammation. In: *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*, edited by Faist E, Meakins J and Schildberg FW. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1993, p. 161-170.
52. Greenhalgh DG and Gamelli RL. Is impaired wound healing caused by infection or nutritional depletion? *Surgery* 102: 306-312, 1987.
53. Greenstein BD, de Bridges EF, and Fritzpatrick FT. Aromatase inhibitors regenerate the thymus in aging male rats. *Int J Immunopharmacol* 14: 541-553, 1992.
54. Guiney DJ, Morris PJ, and Donaldson GA. Wound dehiscence. A continuing problem in abdominal surgery. *ArchSurg* 1966Jan 92: 47-51, 1966.

55. Guo Z, Benten WP, Krucken J, and Wunderlich F. Nongenomic testosterone calcium signaling: genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *J Biol Chem.*, 2002.
56. Hall JP and Davis RJ. Inhibition of the p38 pathway upregulates macrophage JNK and ERK activities, and the ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways are reprogrammed during differentiation of the murine myeloid M1 cell line. *J Cell Biochem* 86: 1-11, 2002.
57. Heagy W, Hansen C, Nieman K, Rodriguez JL, and West MA. Impaired mitogen-activated protein kinase activation and altered cytokine secretion in endotoxin-tolerant human monocytes. *J Trauma* 49: 806-814, 2000.
58. Hunt TK and Hussian Z. Wound environment. In: *Wound healing biochemical and clinical aspects.*, edited by Cohen K, Diegelmann RF and Lindblad WJ. Philadelphia: Saunders, 1992, p. 274-281.
59. Hunt TK, Knighton D, and Goodson W. Wound healing in current surgical diagnosis and treatment. *CritCare Med* 16: 86-98, 1988.
60. Kato M, Honda I, Suzuki H, Murakami M, Matsukawa S, and Hashimoto Y. Interleukin-10 production during and after upper abdominal surgery. *J Clin Anesth* 10: 184-188, 1998.
61. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, and Zimmerman JE. Prognosis in acute organ system failure. *AnnSurg* 202: 685-693, 1985.
62. Knoferl MW, Diodato MD, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage? *Arch Surg* 135: 425-433, 2000.
63. Kondo T and Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: A preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* 108: 231-236, 1996.
64. Kong LB, Lekawa M, Navarro RA, McGrath J, Cohen M, Margulies DR, and Hiatt JR. Pedestrian-motor vehicle trauma: an analysis of injury profiles by age. *J Am Coll Surg* 182: 17-23, 1996.
65. Ksander GA, Ogawa Y, Chu GH, McMullin H, Rosenblatt JS, and McPherson JM. Exogenous transforming growth factor-beta 2 enhances connective tissue formation and wound strength in guinea pig dermal wounds healing by secondary intent. *Ann Surg* 211: 288-294, 1990.
66. Laato M and Heino J. Interleukin 1 modulates collagen accumulation by rat granulation tissue cells both in vivo and in vitro. *Experientia* 44: 32-34, 1988.
67. Lederer J, Rodrick ML, and Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* 11: 153-159, 1999.
68. Lee JC and Young PR. Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leuko Biol* 59: 152-157, 1996.

69. Levenson SM, Upjohn HL, and Preston JA. Effect of thermal burns on wound healing. *Ann Surg* 146: 357-368, 1957.
70. Livingston DH and Malangoni MA. An experimental study of susceptibility to infection after hemorrhagic shock. *SurgGynecolObstet* 168: 138-142, 1989.
71. Livingston DH and Malangoni MA. An experimental study of susceptibility to infection after hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet* 168: 138-142, 1989.
72. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery B, Turner J, Metz CA, and Murray JF. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. *AmRevRespirDis* 141: 94-97, 1990.
73. Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75-81, 1997.
74. Mateo RB, Reichner JS, and Albina JE. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* 266: R1840-R1844, 1994.
75. McGinn FP. Effects of hemorrhage upon surgical operations. *Br J Surg* 63: 742-746, 1976.
76. McGowan JE, Barnes MW, and Finland N. Bacteremia at Boston City Hospital: occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972) with special reference to hospital-acquired cases. *J Infect Dis* 132: 316-335, 1975.
77. Miles AA. Nonspecific defense reactions in bacterial infections. *Ann N Y Acad Sci* 66: 356-369, 1956.
78. Nichols RL. Surgical wound infection. *Am J Med* 91: 54S-64S, 1991.
79. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614, 1992.
80. Nuytinck HKS, Offermans XJMW, Kubat K, and Goris RJA. Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study. *ArchSurg* 123: 1519-1524, 1988.
81. Obata T, Brown GE, and Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 28: N67-N77, 2000.
82. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, and Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 48: 932-937, 2000.
83. Offner PJ, Moore EE, and Biffl WL. Male gender is a risk factor for major infections after surgery. *Arch Surg* 134: 935-940, 1999.
84. O'Keefe GE, Maier RV, Diehr P, Grossman D, Jurkovich GJ, and Conrad D. The complications of trauma and their associated costs in a level I trauma center. *Arch Surg* 132: 920-924, 1997.

85. Polk HCJ. Factors influencing the risk of infection after trauma. *Am J Surg* 165: 2s-7s, 1993.
86. Pruitt JH, Copeland III EM, and Moldawer LL. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock [editorial]. *Shock* 3: 235-251, 1995.
87. Pulendran B, van Driel R, and Nossal GJV. Immunological tolerance in germinal centres. *ImmunolToday* 18: 27-32, 1997.
88. Razandi M, Pedram A, and Levin ER. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem* 275: 38540-38546, 2000.
89. Redl H, Dinges HP, Buurman WA, van der Linden GJ, Pober JS, Cotran RS, and Schlag G. Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in septic but not traumatic/hypovolemic shock in the baboon. *AmJPathol* 139: 461-466, 1991.
90. Rehring TF, Brew EC, Friese RS, Banerjee A, and Harken AH. Clinically accessible cell signaling: second messengers in sepsis and trauma. *J Surg Res* 60: 270-277, 1996.
91. Rose S and Marzi I. Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralbl Chir* 121: 896-913, 1996.
92. Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GAP, Sauerwein RW, van der Meer JW, and Goris RJA. Cytokine patterns in patients after major surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. *Ann Surg* 6: 769-776, 1993.
93. Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, and Norton JA. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg* 214: 175-180, 1991.
94. Samy TS, Knoferl MW, Zheng R, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH. Divergent immune responses in male and female mice after trauma-hemorrhage: dimorphic alterations in T lymphocyte steroidogenic enzyme activities. *Endocrinology* 142: 3519-3529, 2001.
95. Samy TS, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. Androgen and estrogen receptors in splenic T lymphocytes: effects of flutamide and trauma-hemorrhage. *Shock* 14: 465-470, 2000.
96. Samy TSA, Knoferl MW, Zheng R, Schwacha MG, Bland KI, and Chaudry IH. Divergent immune responses in male and female mice after trauma-hemorrhage: dimorphic alterations in T lymphocyte steroidogenic enzyme activities. *Endocrinol* 142: 3519-3529, 2001.
97. Schneider CP, Nickel EA, Samy TSA, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, and Chaudry IH. The aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione, restores immune responses following trauma-hemorrhage in males and decreases mortality from subsequent sepsis. *Shock* 14: 347-353, 2000.

98. Shires GT. Principles and management of hemorrhagic shock. In: *Principles of Trauma Care* (3 ed.), edited by Shires GT. New York: McGraw-Hill, 1985, p. 3-42.
99. Stephan RN, Ayala A, and Chaudry IH. Monocyte and lymphocyte responses following trauma. In: *Pathophysiology of Shock, Sepsis and Organ Failure*, edited by Schlag G and Redl H. Berlin: Springer-Verlag, 1993, p. 131-144.
100. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, and Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *JExpMed* 169: 333-338, 1989.
101. Weigelt JA, Haley RW, and Seibert B. Factors which influence the risk of wound infection in trauma patients. *J Trauma* 27: 774-781, 1987.
102. Wichmann MW, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, and Chaudry I. Flutamide: A novel agent for restoring the depressed cell-mediated immunity following soft-tissue trauma and hemorrhagic shock. *Shock* 8: 1-7, 1997.
103. Wichmann MW, Ayala A, and Chaudry I. Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 273: C1335-C1340, 1997.
104. Wichmann MW, Ayala A, and Chaudry IH. Severe depression of host immune functions following closed bone fracture, soft-tissue trauma and hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 26: 1372-1378, 1998.
105. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, and Chaudry IH. Enhanced Immune Responses in Females as Opposed to Decreased Responses in Males Following Hemorrhagic Shock. *Cytokine* 8: 853-863, 1996.
106. Wimmer C, Gluch H, Franzreb M, and Ogon M. Predisposing factors for infection in spine surgery: a survey of 850 spinal procedures. *J SpinalDisord* 1998Apr 11: 124-128.
107. Wright SD and Kolesnick RN. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *ImmunolToday* 16: 297-302, 1995.
108. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, and Chaudry IH. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock* 4: 149-153, 1995.
109. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, and Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med* 25: 106-110, 1997.
110. Zheng R, Samy TS, Schneider CP, Rue LW, Bland KI, and Chaudry IH. Decreased 5alpha-dihydrotestosterone catabolism suppresses T lymphocyte functions in males after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C1332-C1338, 2002.

111. Zhu X-L, Ayala A, Zellweger R, Morrison MH, and Chaudry IH. Peritoneal macrophages show increased cytokine gene expression following hemorrhagic shock. *Immunology* 83: 378-383, 1994.
112. Zhu X-L, Zellweger R, Zhu X-H, Ayala A, and Chaudry IH. Cytokine gene expression in splenic macrophages and Kupffer cells following haemorrhage. *Cytokine* 7: 8-14, 1995.



## 8 Danksagung

PD Dr. med. Martin Angele danke ich für die Einführung in die wissenschaftliche Tätigkeit sowie die intensive Betreuung dieser Promotion. Zweifellos hat Herr PD Dr. med. Martin Angele den Grundstein für mein wissenschaftliches Interesse gelegt und mich viel über die Arbeit und das Leben gelehrt.

Meinen Eltern widme ich diese Arbeit und danke Ihnen für die unendliche Geduld, die ich gelegentlich strapazierte. Danke für Euer Vertrauen und dafür, dass Ihr mir mein Studium und diese Arbeit ermöglicht habt.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf

Eltern:	Dr. med. Barnim Nitsch Uta Nitsch, geb. Möller
Familienstand:	ledig
Kind:	Paul Jonathan Kropp
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	30.03.1976
Geburtsort:	München
Konfession:	evangelisch

### Aktuelle Tätigkeit

Seit 01.10.2004: Wissenschaftlicher Assistent an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

### Bisherige Tätigkeit

01.01. – 30.09.2004: Arzt im Praktikum an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

### Schul Ausbildung

1982 - 1986: Grundschule [Werdenfelsschule München]

1986 - 06/1995: Ludwigsgymnasium München [Abiturnote: 1,7]

### Ersatzdienst

07/1995 - 08/1996: Zivildienstleistender im Klinikum Großhadern, LMU München

### Studium

09/1996 – 04/2003: Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians Universität, München